



FR00/1447

ESU

REC'D 16 AUG 2000

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **22 JUIN 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA REGLE  
17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

10

11

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **27 MAI 1999**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **99 06708**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**  
DATE DE DÉPÔT **27 MAI 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**CABINET REGIMBEAU**  
**26, Avenue Kléber**  
**75116 PARIS**

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone  
**237745 D18111 PM 01 45 00 92 02**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire  
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen  
demande initiale  
☐ brevet d'invention ☐ certificat d'utilité n°  
Établissement du rapport de recherche ☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**Nouveaux antioxydants, procédés de préparation et utilisations**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)**  
**CONSEILLARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE**

Forme juridique

**ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE**  
**SCIENTIFIQUE ET TECHNO...**  
**ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE**  
**SCIENTIFIQUE, TECHNIQUE ET INDUSTRIEL**

Nationalité (s) **Française, Française**

Adresse (s) complète (s)

**3, rue Michel Ange 75794 PARIS CEDEX 16,**  
**31-33, rue de la Fédération, 75015 PARIS**

Pays

**FR**  
**FR**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES ☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9906708

TITRE DE L'INVENTION :  
utilisations

Nouveaux antioxydants, procédés de préparation et

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)  
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE  
3, rue Michel Ange 75794 PARIS CEDEX 16,  
31-33, rue de la Fédération, 75015 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

OIRY Joël  
Lot Château Bon  
40, Place Gaby Morlay  
34070 Montpellier, FR

PUY Jean-Yves  
Résidence le Gauguin A1  
75, avenue du Pont Trinquat  
34000 Montpellier, FR

IMBACH Jean-Louis  
91, impasse de Luques  
34000 Montpellier, FR

CLAYETTE Pascal  
17, rue Edmé Fremy  
78000 Versailles, FR

FRETIER Philippe  
20, avenue Duvelloy  
94130 Nogent sur Marne, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

27 mai 1999

CABINET REGIMBEAU

92-112,2

La présente invention concerne de nouveaux composés à activité antioxydante, leurs procédés de préparation et leurs utilisations notamment pour la préparation de médicaments destinés à augmenter le taux intracellulaire et/ou extracellulaire de glutathion (GSH).

5 De plus en plus de travaux montrent que les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle important dans de multiples processus biologiques et notamment dans le développement de multiples pathologies humaines et plus particulièrement dans les infections rétrovirales par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

10 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO, ion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, ion hypochloreux, radicaux hydroxyles, etc...) sont des produits naturels dont l'origine est variable; elles proviennent des cellules inflammatoires activées, des cellules métabolisant des xénobiotiques ou des cellules exposées à des milieux environnementaux  
15 particuliers tels la fumée de cigarette.

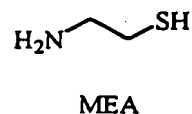
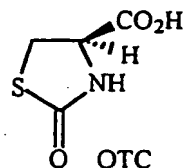
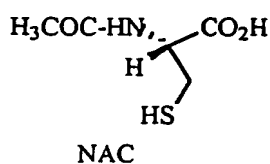
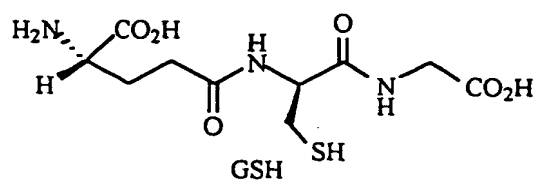
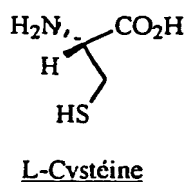
Diverses substances sont connues pour avoir une activité de piègeur de ces espèces réactives de l'oxygène au niveau intracellulaire ou extracellulaire.

On peut citer par exemple le glutathion qui est un tripeptide (L- $\gamma$ -  
20 glutamyl-L-cystéinyglycine, GSH) trouvé dans toutes les cellules eucaryotes. Il est synthétisé et dégradé dans la cellule, principalement via sa forme réduite, le GSH. Ce tripeptide réduit, qui prend part à de nombreuses fonctions cellulaires comme par exemple, la synthèse protéique et nucléique, et le transport d'acides aminés, constitue le  
25 principal mécanisme de défense intracellulaire contre le stress oxydatif. Les facteurs qui favorisent la formation d'espèces réactives de l'oxygène conduisent à la consommation des réserves de glutathion.

La N-acétyl-L-cystéine (NAC) est connue depuis de nombreuses années comme médicament pour la cornée, comme antidote à  
30 l'empoisonnement par l'acétaminophène et comme agent mucolytique en coupant les liaisons disulfures dans les mucoprotéines. Parce que la

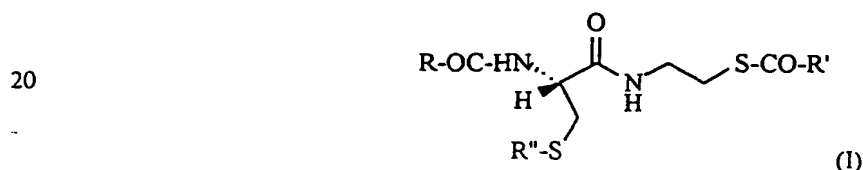
NAC est utilisée thérapeutiquement dans de multiples pathologies dans lesquelles les oxydants semblent jouer un rôle, il a été suggéré qu'elle fonctionne comme un antioxydant. Le mécanisme d'action de la NAC repose sur son aptitude à réduire la cystine extracellulaire en cystéine  
5 ou à être une source de métabolites SH (fonction thiol). Comme source de groupes SH, la NAC stimule la synthèse de GSH, augmente l'activité glutathione-S-transférase, favorise la détoxification et agit directement sur les espèces oxydantes réactives. La NAC et par extension les  
variants acylés de l'acide aminé L-cystéine sont une excellente source  
10 de groupes SH et sont convertis dans l'organisme en métabolites capables de stimuler la synthèse de glutathion, favorisant ainsi la détoxification et agissant directement comme piègeurs d'espèces réactives de l'oxygène.

Compte-tenu du rôle central du GSH dans les mécanismes de  
15 détoxification cellulaire, de nombreuses alternatives visant à remonter son taux intracellulaire ont été envisagées comme stratégie thérapeutique adjuvante dans de nombreuses pathologies humaines et plus particulièrement dans l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au cours des dernières années (WO 92/21368; WO  
20 95/10268; US 4 927 808; US 5 580 577). Tout d'abord, les approches ont cherché à compléter la molécule déficiente. Elles ont ensuite visé à alimenter le cycle du  $\gamma$ -glutamyl. Ainsi, la L-cystéine, le GSH lui-même, la NAC, l'acide 2-oxothiazolidine-4(R)-carboxylique (OTC), et la cystéamine (MEA), dont les formules sont reproduites ci-après, ont été  
25 testés comme adjuvants potentiels aux antirétroviraux dans le traitement des infections par le VIH.



Les effets bénéfiques de ces molécules ont été limités *in vivo* par une faible biodisponibilité, une métabolisation trop rapide, et des concentrations administrables insuffisantes. La NAC par exemple est une molécule relativement labile qui, lors de sa rapide dégradation, relargue des composés contenant des sulfures malodorants tels l' $\text{H}_2\text{S}$ . Ce problème d'instabilité a limité l'utilisation de la NAC, ou d'autres composés fournisseurs d'une source de  $-\text{SH}$ , tels que la L-cystéine ou ses variants acylés, pour la préparation de formulations utilisables en pharmacie, dermatologie ou cosmétique.

Les inventeurs ont maintenant mis au point de nouveaux composés, susceptibles d'agir sur le taux intracellulaire ou extracellulaire de glutathion, qui ne présentent pas l'instabilité qui a été constatée pour les produits connus. C'est pourquoi, la présente invention a pour objet les composés de formule générale (I) suivante:



et dans laquelle:

- R et R' représentent indépendamment un radical alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_7$ , linéaire ou ramifié, ou un groupe aryle non substitué ou substitué

par un ou plusieurs radicaux choisis parmi les halogènes, les radicaux alkyles en C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> linéaires ou ramifiés, et les radicaux -OH (hydroxyle).

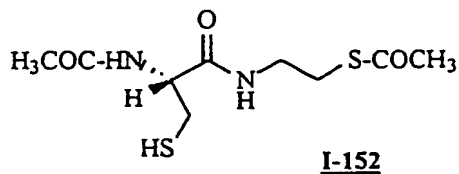
- R'' est l'hydrogène ou un groupe CO-R<sup>1</sup> dans lequel R<sup>1</sup> est un radical alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> linéaire ou ramifié, ou un groupe aryle non substitué ou substitué par un ou plusieurs radicaux choisis parmi les halogènes, les radicaux alkyles en C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> linéaires ou ramifiés, et les radicaux -OH ;

ainsi que les dimères formés par un pont disulfure à partir de l'un et/ou l'autre des deux atomes de soufre de la molécule de formule générale I constitué par les radicaux R'' ou par les radicaux R'CO- des deux molécules ainsi que les formes thiazolidines correspondantes.

De préférence, les radicaux alkyles R, R' et R'' sont en C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>. Les halogènes sont de préférence le chlore et le fluor.

Dans ces composés, la NAC et la MEA sont associées et protégées ou non par des groupements biolabiles.

Dans un mode particulier de réalisation, la présente invention concerne un composé de formule générale I tel que R et R' sont des groupes méthyles (-CH<sub>3</sub>). Dans le mode préféré de réalisation, l'invention concerne le composé dénommé N-(N-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcysté-  
amine appelé ci-après I-152, tel que, dans la formule générale I, R et R' sont des groupes méthyles (-CH<sub>3</sub>) et R'' est l'hydrogène.



Ce composé est particulièrement intéressant pour ses propriétés qui le rendent actif pour le traitement et/ou la prévention de pathologies ou de troubles liés à une déplétion en glutathion intra et/ou extracellulaire, notamment le traitement des infections virales et plus



particulièrement les infections par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Selon un autre mode préféré de réalisation, l'invention concerne le composé dénommé N-(N,S-Bis-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine, appelé ci-après I-176, tel que, dans la formule générale I, R et R' sont des groupes méthyles (-CH<sub>3</sub>) et R" est un groupe acétyle (-COCH<sub>3</sub>).

Selon un autre mode préféré de réalisation, l'invention concerne le composé dénommé N-(N-acétyl-S-isobutyryl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine, appelé ci-après I-177, tel que dans la formule générale I, R et R' sont des groupes méthyles (-CH<sub>3</sub>) et R" est un groupe isobutyryle (-COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

Selon un autre mode préféré de réalisation, l'invention concerne le composé dénommé N-(N-acétyl-S-pivaloyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine, appelé ci-après I-178, tel que dans la formule générale I, R et R' sont des groupes méthyles (-CH<sub>3</sub>) et R" est un groupe pivaloyle (-COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

L'invention concerne les composés de formule I sous la forme libre.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation des composés de formule générale I selon des procédés analogues à ceux utilisés en synthèse peptidique.

Selon un premier mode de réalisation, le procédé selon l'invention comprend les étapes suivantes:

- a) protection de la N-acyl-L-cystéine pour fournir le composé N-acyl-S-trityl-L-cystéine;
- b) couplage de la N-acyl-S-trityl-L-cystéine avec le chlorhydrate de S-acylcystéamine pour fournir le composé N-(N-acyl-S-trityl-L-cystéinyl)-S-acylcystéamine;
- c) réaction de S-détritylation du composé N-(N-acyl-S-trityl-L-cystéinyl)-S-acylcystéamine en solution méthanolique et chloroformique avec un mélange de nitrate d'argent, de

pyridine et de méthanol pour fournir le sulfure d'argent correspondant;

- d) mise en suspension dudit sulfure d'argent correspondant dans du chloroforme puis libération du thiol libre en présence d'HCl ou d'H<sub>2</sub>S.

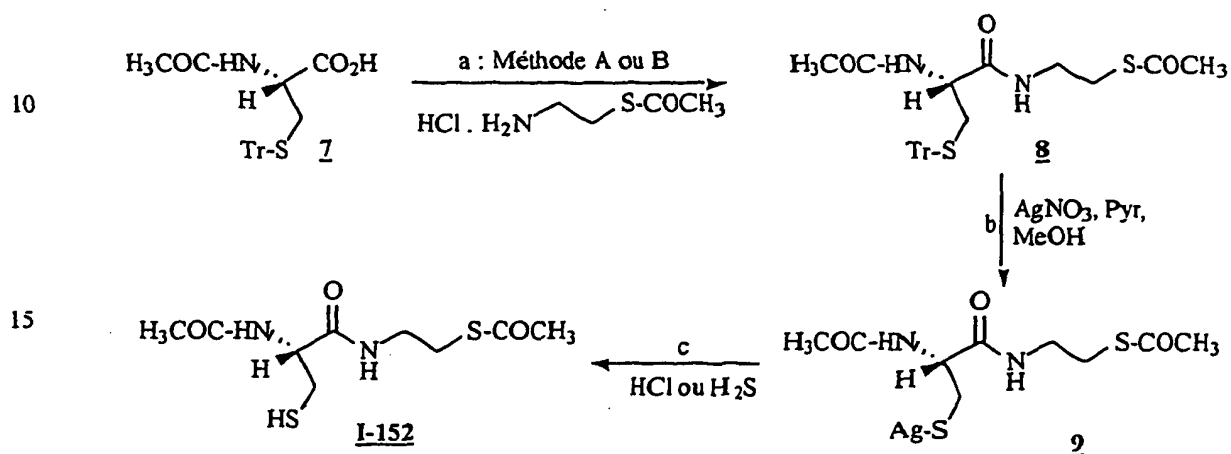
Selon un second mode de réalisation, le procédé selon l'invention, adapté pour la préparation du composé de formule générale I, dans laquelle R = R' et R'' est un hydrogène, comprend les étapes suivantes:

- a) estérification de la fonction carboxylique de la N-Boc-L-sérine (1) par la N-hydroxysuccinimide dans du N, N-diméthylformamide (DMF) en présence de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) pour former l'ester actif (1'); puis,
- b) condensation *in situ* de l'ester actif formé (1') avec l'éthanolamine (2) pour fournir le composé N-(N-Boc-L-séryl)-2-aminoéthanol (3); puis,
- c) réaction de Mitsunobu sur le composé (3) avec de la triphénylphosphine et du diisopropyl azodicarboxylate en présence d'acide thiocarboxylique dans le tétrahydrofurane pour fournir le composé N-(N-Boc-S-acyl-L-cystéinyl)-S-acylcystéamine (4); puis,
- d) déprotection du composé (4) avec l'acide trifluoroacétique.

Dans un mode particulier de réalisation, l'invention concerne deux procédés de préparation du composé I-152.

- Le premier procédé de préparation du composé I-152 (Schéma 1) correspond au procédé de préparation du composé de formule générale (I) décrit précédemment et fait intervenir la L-cystéine correctement protégée. Ce procédé de préparation se caractérise en ce qu'il comprend les étapes suivantes (i) de couplage de la N-acétyl-S-trityl-L-cystéine (7) avec le chlorhydrate de S-acétylcystéamine pour fournir le composé N-(N-acétyl-S-trityl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine (8); puis (ii) de réaction de S-détrytilation du composé N-(N-acétyl-S-trityl-L-cystéinyl)-S-

acétylcystéamine en solution méthanolique et chloroformique avec un mélange de nitrate d'argent, de pyridine et de méthanol pour fournir le sulfure d'argent correspondant (9); puis (iii) de mise en suspension dudit sulfure d'argent correspondant dans du chloroforme; puis (iv) de libération du thiol libre en présence d'HCl ou d'H<sub>2</sub>S.



20 Schéma 1 : Voie 1.

Méthode A: Couplage, via un anhydride mixte formé in situ, de la N-acétyl-S-trityl-L-cystéine (7) avec le chlorhydrate de S-acétylcystéamine; Méthode B: même réaction de couplage, via un ester activé formé in situ, de 7. (b) S-détritylation avec formation du sulfure d'argent correspondant. (c) Libération du thiol libre.

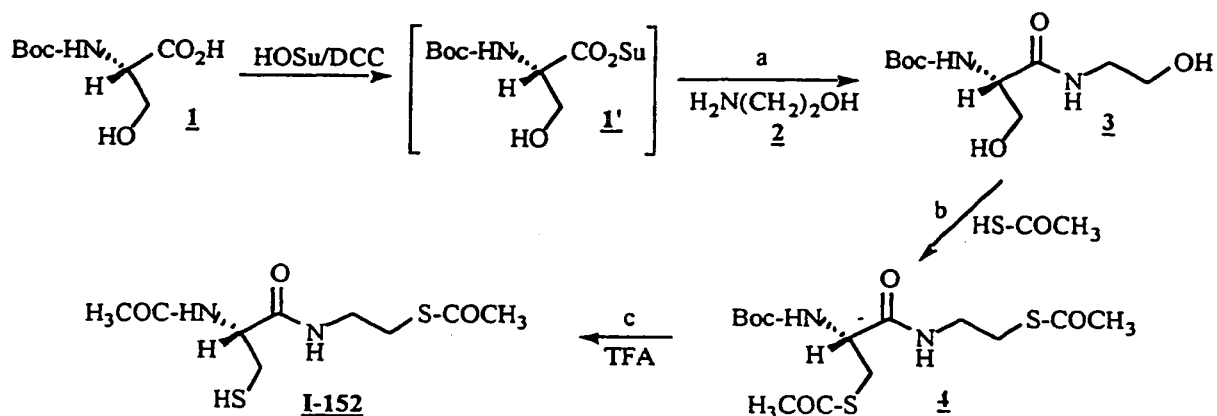
La méthode A est basée sur la formation, in situ, d'un anhydride mixte par réaction de 7 avec le chloroformiate d'isobutyle dans de l'AcOEt, en présence de N-méthylmorpholine (NMM). L'anhydride est ensuite condensé avec la S-acétylcystéamine, libérée de son chlorhydrate par de la NMM, pour fournir 8 avec un rendement après traitements de 55%.

La méthode B utilise, in situ, l'ester actif N-succinimidyl de 7 qui après condensation avec la S-acétylcystéamine, libérée de son chlorhydrate par de la NMM, permet d'obtenir 8 avec un rendement après

traitements de 70%. L'ester actif a été formé par réaction de l'anhydride mixte précédent (Méthode A) avec la N-hydroxysuccinimide dans de l'AcOEt.

Le composé 8, en solution méthanolique et chloroformique, est ensuite S-détritylé par traitement avec un mélange constitué de nitrate d'argent, de pyridine et de méthanol pour fournir le sulfure d'argent correspondant 9. Ce sulfure, qui peut être isolé, est alors mis en suspension dans du  $\text{CHCl}_3$  puis est additionné d'HCl (l'usage d' $\text{H}_2\text{S}$  conduit au même résultat) pour libérer le thiol libre I-152.

Le second procédé de préparation du composé I-152 (Schéma 2) utilise la L-sérine, N-protégée par un t-butoxycarbonyl (Boc) (1), comme produit de départ.



15

Schéma 2 : Voie 2. (a) Couplage de la N-Boc-L-sérine, via un ester activé formé *in situ*, avec l'éthanolamine. (b) Réaction de Mitsunobu, avec un thioacide, sur les alcools primaires avec passage en série L-cystéine. (c) Déprotection de l'amine et transfert S→N du groupement acyle.

20

Ce procédé se caractérise en ce qu'il comprend les étapes suivantes (i) d'activation de la fonction carboxylique de la N-Boc-L-sérine (1) par la N-hydroxysuccinimide dans du DMF en présence de DCC; puis (ii) de condensation *in situ* de l'ester actif formé (1') avec l'éthanolamine (2)

pour fournir le composé N-(N-Boc-L-séryl)-2-aminoéthanol (3); puis (iii) de traitement, selon une réaction de Mitsunobu, modifiée par R.P. Volante (*Tetrahedron Lett.* 1981, 22, 3119-3122), du N-(N-Boc-L-séryl)-2-aminoéthanol avec de la triphénylphosphine et du diisopropyl azodicarboxylate en présence d'acide thioacétique dans le tétrahydrofuranne (THF) pour fournir le composé N-(N-Boc-S-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine (4). Ainsi, le fait de transformer l'alcool de la L-sérine en thioester, tout en conservant la configuration du carbone asymétrique, a permis le passage en série L-cystéine; puis (iv) de déprotection du N-(N-Boc-S-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine avec du TFA; la déprotection classique du N-Boc de 4 avec le TFA ne permet pas d'isoler l'amine correspondante formée 5, qui est instable dans nos conditions opérationnelles, mais elle permet de synthétiser le composé I-152 par réaction de transfert intramoléculaire S→N du groupement acétyle de 5 via la thiazoline correspondante 6 (Schéma 3). De tels transferts, en particulier sur la S-acétylcystéamine, ont déjà été observés et étudiés (R.E. Barnett et coll. ainsi que les références citées, *J. Amer. Chem. Soc.* 1969, 91, 2358-2369). Ces auteurs montrent que le mécanisme de transfert passe, dans certaines conditions de pH, par la formation d'une thiazoline intermédiaire qui ensuite s'hydrolyse pour générer la N-acétylcystéamine. Nous constatons que la formation de la I-152 fait l'objet du même mécanisme puisque nous avons isolé et identifié l'intermédiaire cyclique 6 qui résulte de la N-déprotection de 4 via 5 (Schéma 3).

15-11-1981

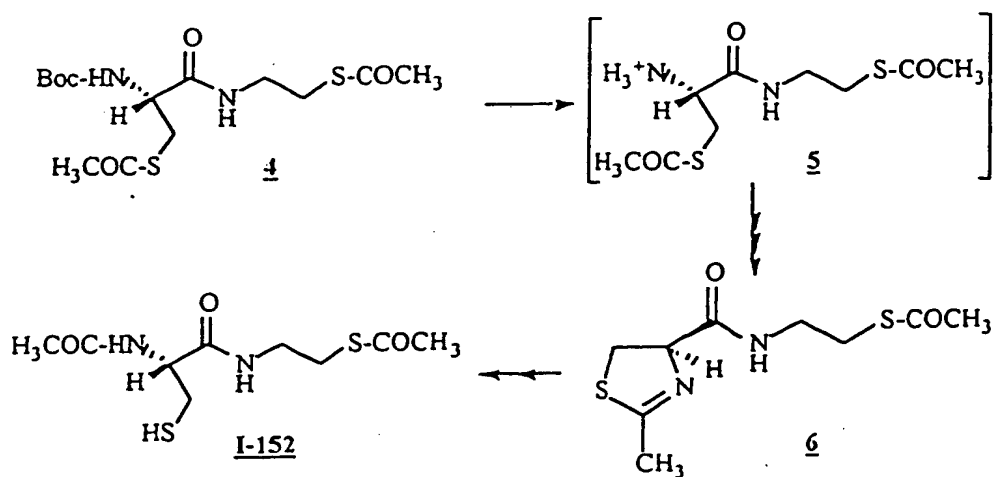


Schéma 3 : Formation de la I-152 par réaction de transfert intramoléculaire S→N du groupement acétyle de **5** via la thiazoline correspondante **6**.

La réaction de transfert S→N du S-acyl, sur le résidu cystéine, permet d'obtenir dans les conditions réactionnelles indiquées le composé I-152.

La présente invention concerne également un procédé de préparation du composé de formule générale I, dans laquelle R, R' sont des groupes méthyles (-CH<sub>3</sub>) et R'' des groupes acyles; la préparation se fait par S-acylation du composé I-152 en solution dans la pyridine en présence d'un anhydride R<sub>2</sub>O ou d'un chlorure d'acide R-Cl caractérisé en ce que R est choisi dans le groupe CO-R<sup>1</sup> dans lequel R<sup>1</sup> est un radical alkyle en C1-C7, linéaire ou ramifié ou un groupe aryle substitué ou non par un ou plusieurs atomes d'halogènes. Ainsi, la préparation du composé I-176 est réalisée par S-acylation du composé I-152, en solution dans la pyridine, avec de l'anhydride acétique. La préparation du composé I-177 est réalisée par S-acylation du composé I-152, en solution dans la pyridine, avec du chlorure d'isobutyryle. La préparation du composé I-178 est réalisée par S-acylation du composé I-152, en solution dans la pyridine, avec du chlorure de pivaloyle.

Les composés de l'invention présentent une caractéristique commune; il s'agit de précurseurs de composés intervenant dans la voie de biosynthèse du glutathion. En d'autres termes, ces composés peuvent être utilisés comme des intermédiaires intervenant dans la voie  
5 de biosynthèse du glutathion. Il peut s'agir par exemple d'un produit choisi dans le groupe formé par la NAC, la MEA, la L-cystéine.

Les composés de l'invention présentent une activité antioxydante. L'invention a donc également pour objet l'utilisation des composés tels que décrits ci-dessus comme agents antioxydants; de tels composés  
10 possèdent une large panoplie d'utilisations telles que l'utilisation dans le traitement préventif et curatif de syndromes pathologiques pour lesquels sont observés un stress oxydatif et un déficit en GSH, les utilisations en cosmétologie ou les utilisations dans l'industrie agroalimentaire.

15 L'invention vise à fournir des agents antioxydants pour lutter contre le stress oxydatif et pour augmenter le taux intracellulaire de glutathion. Les composés de la présente invention peuvent être utilisés, à titre de médicament, en particulier pour augmenter le taux intracellulaire et/ou extracellulaire de glutathion.- L'invention couvre  
20 également l'utilisation d'un composé selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à augmenter le taux intracellulaire et/ou extracellulaire de glutathion. La présente invention concerne également une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité efficace d'un composé selon  
25 l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. L'invention porte également sur l'utilisation d'un composé selon l'invention pour la préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention de pathologies ou de troubles liés à une déplétion en glutathion intra et/ou extracellulaire.

30 Les pathologies qui peuvent faire l'objet d'une prophylaxie ou d'un traitement par les composés de l'invention sont notamment les

infections virales, les infections bactériennes, les infections parasitaires, les maladies du tractus respiratoire, les maladies neurodégénératives, les maladies auto-immunes, les maladies cardio-vasculaires, les cancers, les maladies du système immunitaire, le diabète, et de  
5 préférence le diabète de type I, les pathologies ophtalmiques, les maladies dermatologiques.

L'invention porte plus particulièrement sur l'utilisation d'un composé tel que décrit précédemment pour la préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique pour le traitement  
10 et/ou la prévention des infections virales; il s'agit en particulier des infections virales causées par les virus à ADN et les virus à ARN, et plus particulièrement par les virus rétroïdes, plus particulièrement le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et de manière préférée le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). L'infection par le VIH est  
15 responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) qui constitue une pathologie humaine pour laquelle les oxydants jouent un rôle important. Le SIDA constitue un problème de santé publique pour beaucoup de pays dans le monde depuis 1981, date à laquelle la maladie a été pour la première fois identifiée. Lorsque le SIDA est  
20 déclaré, la mort survient généralement deux à trois ans après le diagnostic suite à un effondrement des défenses immunitaires du patient et à de multiples infections opportunistes. Au cours de l'infection par le VIH, une diminution des taux cellulaires et plasmatiques des molécules antioxydantes est observée. Ce dérèglement  
25 immunitaire baptisé « stress oxydatif » est critique pour le malade. Il semble jouer un rôle majeur dans la physiopathologie des infections par le VIH en augmentant la réplication virale, le syndrome inflammatoire, l'apoptose, la perte de poids des patients (cachexie), et les intoxications médicamenteuses. Si les mécanismes contribuant à ce stress oxydatif  
30 sont mal connus, il semble probable que le syndrome inflammatoire chronique associé aux infections à VIH, l'amplifie. De même, le VIH via



la protéine Tat semble lui-même jouer un rôle majeur. En effet, cette protéine bloque la production et la sécrétion de la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD), une enzyme susceptible de prévenir le stress oxydatif, et diminue fortement l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), une enzyme nécessaire au maintien  
5 du glutathion sous sa forme réduite.

Chez les individus infectées par le VIH, les thiols et tout particulièrement le GSH sont diminués dans le plasma, et les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP). Les atteintes sont aussi  
10 bien sanguines que tissulaires puisque le déficit en GSH est retrouvé dans les lavages broncho-alvéolaires et dans le système nerveux central (SNC). Ces doubles localisations d'une part confirment que les deux cibles majeures du VIH, les lymphocytes et les macrophages sont touchés, et d'autre part illustrent l'ampleur du déficit. Ceci peut  
15 probablement expliquer, tout du moins pour une part, les résultats publiés par L.A. Herzenberg et coll. (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, 94, 1967-1972). Ces auteurs montrent l'existence d'un lien direct entre la survie des malades et le taux de GSH.

La thérapeutique antirétrovirale actuelle repose sur deux familles  
20 de molécules, les inhibiteurs de la transcriptase inverse (TI), (AZT, ddI, névirapine, etc...) et les inhibiteurs de la protéase virale (indinavir, saquinavir, etc...). Elles sont dotées d'une certaine activité *in vivo* lorsqu'elles sont associées entre elles. Toutefois, ces molécules sont incapables de réorganiser pleinement les atteintes tissulaires telles par  
25 exemple les syndromes inflammatoire et oxydatif dans le SNC et ont une efficacité réduite ou nulle vis-à-vis des pathologies associées à l'infection par le VIH. Compte-tenu du rôle majeur du GSH dans le contrôle de ces deux syndromes et de sa pluralité d'effets dans la physiopathologie des infections à VIH, de nombreuses alternatives  
30 visant à remonter son taux intracellulaire ont été envisagées sans

succès comme stratégie thérapeutique adjuvante au cours des dernières années.

L'expansion continue des infections par le virus VIH et des infections opportunistes associées rend nécessaire de disposer d'un traitement efficace contre le SIDA et les atteintes tissulaires associées. L'un des buts de la présente invention est donc d'utiliser les composés répondant à la formule générale (I), de préférence les composés I-152 et/ou I-176 et/ou I-177 et/ou I-178, pour la préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention des infections virales provoquées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et plus particulièrement le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). La présente invention fournit également une composition pharmaceutique, pour le traitement préventif et curatif du SIDA et des atteintes tissulaires associées, caractérisée en ce qu'elle contient une quantité thérapeutiquement efficace d'un composé selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. La présente invention porte également sur un produit comprenant au moins un composé selon l'invention et au moins un inhibiteur de la transcriptase inverse et/ou comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps en thérapie antivirale. L'inhibiteur de la transcriptase inverse est choisi par exemple parmi le 3'-azido-3'désoxythymidine (AZT), le 2',3'-didésoxyinosine (ddI), le 2',3'-didésoxycytidine (ddC), le (-)-2',3'-didésoxy-3'-thiacytidine (3TC), le 2',3'-didéshydro-2',3'-didésoxythymidine (d4T) et le (-)-2'-désoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine (FTC), le TIBO, le HEPT, le TSAO, l' $\alpha$ -APA, la névirapine, le BAHP, l'acide phosphonoformique (PFA). L'inhibiteur de la protéase virale est choisi plus particulièrement parmi l'indinavir et le saquinavir.

Il est également dans l'étendue de l'invention d'utiliser les composés répondant à la formule générale (I), de préférence les composés I-152 et/ou I-176 et/ou I-177 et/ou I-178, pour la

préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention de maladies cardio-vasculaires choisies de préférence parmi le groupe composé de l'hypertension artérielle, de l'artériosclérose, des ischémies cérébrales, des ischémies cardiaques, des arythmies ventriculaires, des fibrillations ventriculaires, de l'infarctus du myocarde. En effet, les patients atteints d'hypertension artérielle traités avec des nitrates organiques développent fréquemment des résistances aux effets de ces drogues. Il a été suggéré que cette tolérance est associée entre autres facteurs à la déplétion en groupes thiols dans les muscles lisses vasculaires. Il a été démontré que des précurseurs métaboliques du glutathion tels la NAC préviennent le développement de la tolérance ou au moins restaurent les effets des nitrates organiques (Abrams 1991, Horowitz 1991, Bøsegaard et al. 1993). La présente invention se propose donc de fournir de nouveaux composés pour prévenir le développement de la tolérance ou au moins restaurer les effets des nitrates organiques utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle. Heller et al. (1997) ont expérimentalement démontré l'action de différentes espèces réactives de l'oxygène dans l'inflammation des îlots de Langerhans et dans la destruction des cellules  $\beta$ . La présente invention a donc pour objet de fournir de nouveaux composés pour le traitement et la prévention du diabète de type I (IDDM) (Rabinovitch et al, 1992).

Le stress oxydatif et le déficit en GSH interviennent également dans d'autres pathologies. Ainsi, dans le domaine de l'ophtalmologie, ils sont à relier avec l'apparition de la cataracte. Il est donc dans l'étendue de l'invention d'utiliser les composés répondant à la formule générale (I), de préférence les composés I-152 et/ou I-176 et/ou I-177 et/ou I-178, pour la préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention de pathologies ophtalmiques telles que les atteintes oculaires du syndrome de Sjogren et la cataracte.

Il est également dans l'étendue de l'invention d'utiliser les composés répondant à la formule générale (I), de préférence les composés I-152 et/ou I-176 et/ou I-177 et/ou I-178, pour la préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique  
5 pour le traitement et/ou la prévention des maladies du tractus respiratoire, notamment l'emphysème pulmonaire, la fibrose pulmonaire idiopathique, la mucoviscidose, la bronchite chronique, la bronchite aiguë, le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte.

L'invention porte également sur l'utilisation d'un composé tel que  
10 décrit précédemment pour la préparation de médicaments destinés au traitement préventif et/ou curatif des pertes auditives liées au bruit.

L'invention porte également sur l'utilisation d'un composé tel que décrit précédemment pour la préparation de médicaments destinés au traitement des empoisonnements liés à l'administration par voie orale  
15 ou parentérale, en surdose ou non, de substances choisies de préférence parmi le groupe composé de l'acétaminophène, les nitrites, l'éthanol, l'acrylonitrile, les métaux lourds et plus particulièrement l'or, l'argent, le mercure.

Les propriétés antioxydantes du composé de l'invention  
20 recommandent son utilisation dans le domaine de la cosmétique. En effet, les antioxydants sont déjà utilisés en cosmétologie pour ralentir le vieillissement. Les composés de la présente invention sont capables de promouvoir la reconstruction du contenu cellulaire de GSH et de fournir une protection efficace contre les dommages cellulaires causés par des  
25 facteurs toxiques extrinsèques et intrinsèques; la peau est le lieu d'agression de ces facteurs. Les facteurs extrinsèques incluent par exemple les radiations ultraviolettes, le vent, la faible humidité, les abrasifs et les agents tensioactifs forts. Les facteurs intrinsèques incluent le vieillissement chronologique et les modifications  
30 biochimiques de la peau. Qu'ils soient extrinsèques ou intrinsèques, ces facteurs provoquent l'apparition de rides et d'autres changements

histologiques associés au vieillissement de la peau. Les agents anti-rides connus à l'heure actuelle incluent des composés tels la N-acétyl-L-cystéine, les rétinoïdes tels que l'acide rétinoïque et les acides alpha-hydroxy tels que l'acide glycolique et l'acide lactique. C'est donc l'un des

5 objets de l'invention d'utiliser les propriétés antioxydantes des composés selon l'invention pour (i) prévenir, effacer et traiter les rides, les ridules de la peau; et/ou (ii) lutter contre le relâchement cutané et/ou sous cutané; et/ou (iii) améliorer la texture de la peau et raviver l'éclat de la peau; et/ou (iv) éliminer les poils indésirés de la peau; et/ou

10 (v) diminuer les tailles des pores de la peau; et/ou (vi) déformer en permanence les cheveux. Concernant ce dernier point, il convient de noter que des molécules organiques porteuses de groupes fonctionnels thiols tels les composés selon l'invention sont des produits ayant de multiples applications. Une de ces applications est la déformation

15 (frisage et défrisage) permanente des cheveux, qui consiste, dans un premier temps, à réaliser l'ouverture des liaisons disulfures (S-S) des unités cystine de la kératine à l'aide d'une composition contenant au moins un composé organique porteur de groupe fonctionnel thiol agissant comme réducteur (étape de réduction) -ce qui permet de

20 conférer aux cheveux la forme que l'on souhaite; puis après avoir rincé la chevelure, à reconstituer, dans un second temps, lesdites liaisons disulfures en appliquant, sur les cheveux une composition oxydante (étape d'oxydation, dite aussi de fixation), de façon à fixer les cheveux dans la forme qui leur a été donnée. L'invention concerne donc une

25 composition cosmétique pour le traitement de la peau et/ou des cheveux et/ou des poils caractérisée en ce qu'elle contient un composé selon l'invention et un excipient cosmétiquement acceptable. L'invention porte également sur un procédé de traitement cosmétique de la peau pour prévenir, effacer et traiter les rides, les ridules de la peau et/ou

30 lutter contre le relâchement cutané et/ou sous-cutané et/ou améliorer la texture de la peau et raviver l'éclat de la peau et/ou éliminer les poils

indésirés de la peau et/ou diminuer les tailles des pores de la peau comprenant l'application sur la peau d'une composition cosmétique telle que précédemment décrite.

Les propriétés antioxydantes du composé de l'invention  
 5 recommandent son utilisation dans le domaine agroalimentaire. Il est donc dans la portée de cette invention d'utiliser les composés de l'invention en tant qu'agents antioxydants pour la conservation des propriétés organoleptiques et nutritionnelles des boissons notamment les jus de fruits, et les aliments.

10 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux mis en évidence à la lecture des exemples suivants

Dans ces exemples on se référera aux figures suivantes :

**Figure 1** : décomposition probable de la I-152.

**Figure 2** : comparaison des activités antivirales de la NAC, de la MEA et  
 15 de la I-152 dans des cultures de MDM infectés par 10 000 TCID<sub>50</sub> de l'isolat VIH-1/Ba-L : effet-doses. Les résultats sont exprimés selon la moyenne  $\pm$  écart-type des pourcentages d'inhibition. La réplication virale a été mesurée par le dosage de l'activité transcriptase inverse dans les surnageants de culture.

20 **Figure 3** : cytotoxicité de la NAC, MEA et I-152 vis-à-vis des MDM.

**Figure 4** : mesure de l'activité TI et de la production de la protéine p25 dans les surnageants de culture de MDM infectés par la souche VIH-1/Ba-L, et traités par la I-152.

**Figure 5** : effet de la m.o.i. sur l'activité antivirale de la I-152. Les MDM  
 25 ont été infectés par 1 000 ou 10 000 TCID<sub>50</sub> de l'isolat VIH-1/Ba-L.

**Figure 6** : Effets de la I-152 sur la réplication virale selon le mode de traitement : pré-traitement 24 heures, traitement 24 heures après l'infection, traitement 7 jours après l'infection.

**Figure 7** : activité antivirale de la I-152 dans les CMSP quiescentes ou  
 30 activées par la PHA-P, et infectées par la souche VIH-1-LAI.

**Figur 8** : activité antivirale de la I-152 dans des LSP quiescents ou activés par la PHA-P, puis infectés par la souche VIH-1-LAI.

**Figure 9** : effets de la I-152 sur l'intégration du provirus au sein du génome cellulaire.

5 **Figure 10** : effets de la I-152 sur l'activité enzymatique de la TI du VIH-1. Les expériences ont été réalisées en triplicat.

**Figure 11** : dosage du glutathion total intracellulaire dans les CMSP quiescentes, traitées 24 heures avant par la NAC, la MEA ou la I-152.

10 **Figure 12** : activité antivirale des dérivés de la I-152 (la I-176 est cytotoxique à la dose testée).

**Tableau I** : Comparaison des activités antivirales de la NAC, de la MEA et de la I-152 dans des cultures de MDM infectés par 10 000 TCID<sub>50</sub> de l'isolat VIH-1/Ba-L : doses effectrices 50, 70 et 90%.

15 **Tableau II** : Effets de la m.o.i. sur l'activité antivirale de la I-152 : doses effectrices 50%.

### **EXEMPLE 1: SYNTHÈSE DE LA N-(N-ACÉTYL-L-CYSTEINYL)-S-ACÉTYLCYSTEAMINE (I-152)**

20 **1.1. Première voie de synthèse de la I-152 utilisant la L-cystéine S, N protégée :**

#### **1.1.1. N-(N-ACÉTYL-S-TRITYL-L-CYSTEINYL)-S-ACÉTYLCYSTEAMINE (8)**

25 **a)- Méthode de couplage faisant intervenir *in situ* un anhydride mixte**

Une solution contenant 290 mg (0,71 mmole) de N-acétyl-S-trityl-L-cystéine (**7**, Bachem) et 80 µL (0,72 mmole) de N-méthylmorpholine (NMM) dans 5 ml d'AcOEt est agitée à -15°C puis additionnée de 93 µl (0,71 mmole) de chloroformiate d'isobutyle. Après 15 min d'agitation et  
30 en maintenant la température initiale, on ajoute 111,4 mg (0,71 mmole) de chlorhydrate de S-acétylcystéamine (préparé selon T. Wieland et E.

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN

Bokelman, *Ann. Chem.*, 1952, 576, 20-34) puis 80  $\mu$ l (0,72 mmole) de NMM. Le mélange réactionnel est maintenu 15 min à -15°C puis, après retour à la température ambiante, on poursuit l'agitation durant 3 h. Le chlorhydrate de NMM formé est filtré et lavé avec 2 x 2,5 ml d'AcOEt et les phases organiques rassemblées sont évaporées à sec sous vide. Le produit de couplage est ensuite isolé de la gomme obtenue par « flash » chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt/éther de pétrole 30%). On recueille 198 mg (Rdt = 55%) du composé attendu.  $R_f$  (AcOEt/éther de pétrole, 9 : 1) : 0,41. Cristallise dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole sous forme d'une poudre incolore.  $F = 111-113^\circ\text{C}$ .  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +10,5^\circ$  (c 0,8;  $\text{CHCl}_3$ ).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm : 1,90 (s, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ); 2,29 (s, 3H,  $\text{SCOCH}_3$ ); 2,48 (dd,  $J = 5,7; 12,9$  Hz, 1H,  $\beta$  Ha cys); 2,82 (dd,  $J = 6,4; 12,9$  Hz, 1H,  $\beta$  Hb cys); 2,92-3,01 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ); 3,32-3,42 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ); 4,07-4,20 (m, 1H,  $\alpha$  H cys); 5,70 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H, NH cys); 6,34 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ); 7,19-7,35 et 7,40-7,47 (2m, 15H, H aromatiques). SM : (FAB $^+$ /NBA+K $^+$ )  $m/z$  545 (M+K) $^+$ , 507 (M+H) $^+$ ; (FAB $^-$ /NBA)  $m/z$  505 (M-H) $^-$ .

Analyse :  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$  (506)

20 Calc. % : C 66,40 H 5,93 N 5,53

Tr. % : 66,17 6,00 5,81

#### b)- Méthode de couplage faisant intervenir *in situ* un ester activé

Une solution contenant 1,5 g (3,70 mmoles) de **7** et 410  $\mu$ L (3,73 mmoles) de NMM dans 30 ml d'AcOEt est agitée à -15°C puis additionnée de 480  $\mu$ l (3,70 mmoles) de chloroformiate d'isobutyle. Après 15 min d'agitation et en maintenant la température initiale, on ajoute 426 mg (3,70 mmoles) de N-hydroxysuccinimide. Le mélange réactionnel est maintenu 15 min à -15°C puis, après retour à la température ambiante, on poursuit l'agitation durant 2 h. Le chlorhydrate de NMM formé est filtré et lavé avec 2 x 5 ml d'AcOEt. Les



phases organiques contenant l'ester actif O-N-succinimide de **7** sont rassemblées et agitées à -15°C. La solution est alors additionnée successivement de 575 mg (3,70 mmoles) de chlorhydrate de S-acétylcystéamine et de 410 µL (3,73 mmoles) de NMM. Le mélange réactionnel est maintenu 15 min à -15°C puis, après retour à la température ambiante, on poursuit l'agitation durant 12 h. La solution est ensuite diluée avec 300 ml d'AcOEt, lavée (eau, 30 ml; bicarbonate de sodium saturé et glacé, 30 ml; eau, 30 ml; acide citrique 0,1N glacé, 30 ml; eau, 3 x 30 ml), séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée à sec sous vide. Le résidu obtenu est ensuite purifié comme ci-dessus pour donner, avec un rendement de 70% (1,31 g) et avec rigoureusement les mêmes critères physico-chimiques, le produit de couplage **8** précédemment décrit.

#### 1.1.2. N-(N-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-ACETYLCYSTEAMINE (I-152)

Une solution, saturée et protégée de la lumière, de 1,26 g (2,49 mmoles) de **8** dans 20 ml de MeOH et 1,5 ml de CHCl<sub>3</sub> est agitée à la température ambiante et additionnée d'un mélange, également protégé de la lumière, contenant 449 mg (2,64 mmoles) de nitrate d'argent et 213 µl (2,64 mmoles) de pyridine dans 13 ml de MeOH. Instantanément, il y a formation d'un précipité du sulfure d'argent correspondant **9**. A la fin de l'ajout, l'agitation est arrêtée et le mélange réactionnel est abandonné une nuit à la température ambiante. Le précipité est ensuite filtré et lavé avec du MeOH (2 x 10 ml) puis avec du CHCl<sub>3</sub> (2 x 10 ml).

Un échantillon analytique de **9** est prélevé puis séché sous vide à l'abri de la lumière.

Analyse : C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>Ag (371)

Calc. % : Ag 29,11

Tr. % : 29,16

Le sulfure précédent **9** est mis en suspension dans 15 ml de CHCl<sub>3</sub> et agité à la température ambiante et à l'abri de la lumière, puis

additionné de 400  $\mu$ l d'acide chlorhydrique concentré. L'agitation est poursuivie 2 h à la température ambiante puis 2 min à 30-35 °C. Le mélange est alors dilué avec 70 ml de  $\text{CHCl}_3$  et le chlorure d'argent formé est filtré puis lavé avec 3 x 10 ml du même solvant. Les phases  
 5 organiques sont rassemblées, lavées rapidement à l'eau glacée (3 x 10 ml), séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées à sec sous vide. On recueille une pâte semi-cristalline qui cristallise dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole sous forme de microcristaux incolores (368 mg, Rdt = 56%).  $F = 121-122^\circ\text{C}$ .  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -39,1^\circ$  (c 0,9;  $\text{CHCl}_3$ ). Les autres  
 10 données (microanalyses et spectres) sont en tous points identiques à celles décrites dans la deuxième voie de synthèse.  
 L' $\text{H}_2\text{S}$  a aussi été utilisé et conduit au même résultat.

## 1.2. Deuxième voie de synthèse de la I-152 utilisant la L-sérine N-protégée:

### 1.2.1. N-(N-Boc-L-SERYL)-2-AMINOETHANOL (3)

Une solution contenant 6,15 g (30 mmoles) de N-Boc-L-sérine (1, Fluka) et 3,45 g de N-hydroxysuccinimide (30 mmoles) dans 80 ml de  
 20 DMF est agitée à 0 °C et additionnée de 6,2 g (30 mmoles) de DCC. Le mélange réactionnel est maintenu 15 min à 0 °C puis on le laisse revenir à la température ambiante et on poursuit l'agitation durant 1 h 30. On ajoute ensuite 2,75 ml (60 mmoles) d'éthanolamine. Après 12 h d'agitation, la DCU formée est filtrée et lavée avec 2 x 15 ml de DMF.  
 25 Les phases organiques rassemblées sont évaporées à sec sous vide. Le produit est isolé de la pâte résiduelle par « flash » chromatographie sur colonne de gel de silice (Kieselgel Merck 60, 230-400 mesh; éluant :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  6%,). On recueille le composé attendu sous forme d'une gomme qui cristallise dans un mélange d'AcOEt/hexane pour fournir  
 30 5,21 g (Rdt = 70%) d'aiguilles incolores.  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9,3 : 0,7) :

0,23; (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH, 9 : 0,9 : 0,1) : 0,47. F = 74-76°C.  $[\alpha]_{D^{20}} = -2,2^{\circ}$  (c 0,9; CHCl<sub>3</sub>).

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm : 1,50 (s, 9H, *H* *t*-butyl); 3,18-3,29 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 3,45-3,55 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 3,57-3,70 (m, 2H, β CH<sub>2</sub> ser); 4,01-4,10 (m, 1H, α *H* ser); 4,77 (t, J = 5,4 Hz, 1H, OH ser); 4,91 (t, J = 5,7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 6,71 (d, J = 8,2 Hz, 1H, NH ser); 7,86 (t, J = 5,5 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>).

SM : (FAB<sup>+</sup>/G-T) *m/z* 745 (3M+H)<sup>+</sup>, 497 (2M+H)<sup>+</sup>, 249 (M+H)<sup>+</sup>.

Analyse : C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (248)

10 Calc. % : C 48,39 H 8,06 N 11,29

Tr. % : 8,57 8,08 11,08

#### 1.2.2. N-(N-Boc-S-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-ACETYLCYSTEAMINE (4)

Une solution contenant 2,597 g (9,91 mmoles) de triphénylphosphine et 1,95 ml (9,91 mmoles) de diisopropyl azodicarboxylate dans 15 ml de THF est agitée 30 min à 0 °C (au bout de 30 s d'agitation, on observe la formation d'un intense précipité). En conservant cette température, on additionne successivement 1,116 g (4,50 mmoles) de **3** en solution dans 6 ml de THF puis 707 μl (9,91 mmoles) d'acide thioacétique. On laisse ensuite la solution obtenue revenir à la température ambiante et on poursuit l'agitation durant 12 h. Le mélange réactionnel est alors évaporé à sec sous vide. Le produit est isolé de la pâte résiduelle par « flash » chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : hexane puis AcOEt/éther de pétrole 75%). On recueille le composé attendu sous forme d'une gomme qui cristallise dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole sous forme d'aiguilles incolores (1,21 g; Rdt = 74%). R<sub>f</sub> (AcOEt/éther de pétrole, 4 : 6) : 0,35. F = 111-113 °C.  $[\alpha]_{D^{20}} = -13,9^{\circ}$  (c 0,86; CHCl<sub>3</sub>).

30 RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm : 1,45 (s, 9H, *H* *t*-butyl); 2,36, 2,38 (2s, 2 x 3H, 2 x SCOCH<sub>3</sub>); 2,99-3,07 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S); 3,19 (dd, J = 7,8; 14,3 Hz, 1H, β *H*<sub>a</sub> cys); 3,34 (dd, J = 4,5; 14,3 Hz, 1H, β *H*<sub>b</sub> cys); 3,40-3,50 (m,

2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S); 4,19-4,34 (m, 1H,  $\alpha$  H cys); 5,25 (d, J = 7,1 Hz, 1H, NH cys); 6,69 (t, J = 5,2 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>).

SM : (FAB<sup>+</sup>/NBA)  $m/z$  729 (2M+H)<sup>+</sup>, 365 (M+H)<sup>+</sup>.

Analyse : C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> (364)

5 Calc. % : C 46,15 H 6,59 N 7,69

Tr. % : 46,45 6,51 7,47

### 1.2.3. N-(N-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-ACETYLCYSTEAMINE (1-152)

Une solution contenant 500 mg (1,37 mmole) de **4** dans 5 ml de  
 10 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est agitée, sous argon à 0 °C, puis additionnée de 1 ml (13,07  
 mmoles) de TFA. On laisse ensuite la solution revenir à la température  
 ambiante et on poursuit l'agitation durant 7 h. A ce stade, la réaction  
 contrôlée par CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9,4: 0,6) montre la disparition du  
 composé de départ (R<sub>f</sub> : 0,75) et l'apparition de deux spots plus polaires  
 15 (R<sub>f</sub> : 0,5 et 0,16). Le mélange réactionnel est évaporé à sec sous vide  
 (température du bain-marie : <40 °C).

Un nouveau contrôle par CCM, de la gomme obtenue, indique que  
 le spot majoritaire précédent à R<sub>f</sub> : 0,16 est devenu minoritaire au profit  
 de celui à R<sub>f</sub> : 0,5. On note également l'apparition d'un troisième spot,  
 20 de moindre importance, à R<sub>f</sub> : 0,4. A ce stade, nous avons réalisé une  
 « flash » chromatographie sur une aliquote de la gomme ( 20 mg) afin  
 d'identifier les composés présents pour élucider ce phénomène:

- Avec un mélange d'éluants constitué de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /Et<sub>2</sub>O (5 : 5), on isole  
 le produit de R<sub>f</sub> : 0,5. L'étude de ses spectres (RMN <sup>1</sup>H et SM) montre,  
 25 sans ambiguïté, qu'il s'agit de la N-(2-méthyl- $\Delta^2$ -thiazoliny-4(R)-  
 carbonyl)-S-acétylcystéamine **6** :

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm : 2,32 (s, 3H, SCOCH<sub>3</sub>); 2,39 (d, J = 1,3 Hz, 3H,  
 2-CH<sub>3</sub> thiazoline); 3,05 (t app., J = 6,4 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S); 3,36-3,60  
 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S); 3,69 (dd, J = 10,2; 11,4 Hz, 1H, 5-H thiazoline);  
 30 3,85 (dd, J = 7,2; 11,4 Hz, 1H, 5'-H thiazoline); 5,08 (ddd, J = 1,3; 7,2;  
 10,2 Hz, 1H, 4-H thiazoline); 7,45-7,58 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>).

SM : (FAB<sup>+</sup>/G-T)  $m/z$  493 (2M+H)<sup>+</sup>, 247 (M+H)<sup>+</sup>.

- En augmentant la polarité du solvant d'élution (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9,5 : 0,5), on isole le composé intermédiaire (R<sub>f</sub> : 0,4). L'étude de ses spectres (RMN <sup>1</sup>H et SM) montre qu'il s'agit de la I-152. Ses données physico-  
5 chimiques sont rapportées à la fin de cette description.

- La poursuite de la chromatographie avec des éluants plus polaires (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 5-20%) n'a pas permis d'obtenir le produit de R<sub>f</sub> : 0,16. Ce composé qui est le premier formé dans la réaction de déprotection de la fonction amine terminale du N-Boc de départ ne peut être que le  
10 trifluoroacétate de la N-(S-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine **5**.

\* Tous les essais réalisés et contrôlés par CCM nous ont montré, dans nos conditions opérationnelles (temps nécessaire à la consommation totale du produit de départ, température et pH du milieu réactionnel), que **5**, qui est le premier formé lors de déprotection du N-Boc par le  
15 TFA, génère l'intermédiaire cyclique **6** qui s'hydrolyse ensuite lentement pour donner la I-152.

Ainsi, après ces différentes constatations, la gomme restante obtenue après évaporation du brut réactionnel a été solubilisée dans 150 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puis additonnée, à la température ambiante et sous  
20 forte agitation, de 5 ml d'eau. Après 6 h d'agitation, le contrôle par CCM ne montre plus qu'un seul spot correspondant au produit désiré. La phase organique est décantée et l'eau résiduelle est extraite avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10 ml). Les phases organiques sont ensuite rassemblées, séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées à sec sous vide. On  
25 recueille le composé attendu sous forme d'une pâte semi-cristalline. R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9,5 : 0,5) : 0,4. Cristallise dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole sous forme de microcristaux incolores (245 mg, Rdt = ≥67%). F = 122-124°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -40° (c 0,87; CHCl<sub>3</sub>).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm : 1,60 (dd, J = 7,6; 10,3 Hz, 1H, SH); 2,07 (s, 3H, NCOCH<sub>3</sub>); 2,36 (s, 3H, SCOCH<sub>3</sub>); 2,70 (ddd, J = 6,5; 10,3; 13,9 Hz, 1H, β Ha cys); 3,03 (t, J = 6,3 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S); 3,06 (ddd, J = 4,3; 7,6;  
30

13,9 Hz, 1H,  $\beta$  Hb cys); 3,46 (td,  $J = 6,0$ ; 6,3 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ); 4,59 (ddd,  $J = 4,3$ ; 6,5; 7,9 Hz, 1H,  $\alpha$  H cys); 6,52 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H, NH cys); 6,75-6,90 (m, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ).

SM : (FAB<sup>+</sup>/G-T)  $m/z$  529 (2M+H)<sup>+</sup>, 265 (M+H)<sup>+</sup>.

5 Analyse :  $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$  (264)

Calc. % : C 40,91 H 6,06 N 10,61 S 24,24

Tr. % : 41,21 6,00 10,91 23,99

## 10 **EXEMPLE 2: SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS S-ACYLES DE LA N-(N-ACÉTYL-L-CYSTEINYL)-S-ACÉTYLCYSTEAMINE (I-152)**

### **2.1. N-(N,S-BIS-ACÉTYL-L-CYSTEINYL)-S-ACÉTYLCYSTEAMINE (I-176)**

(Méthode générale de S-acylation)

15 Une solution contenant 83 mg (0,31 mmole) de I-152 dans 1 ml de pyridine est agitée à 0 °C et additionnée de 90  $\mu\text{l}$  (0,95 mmole) d'anhydride acétique. Le mélange réactionnel est maintenu 15 min à 0 °C puis on le laisse revenir à la température ambiante et on poursuit l'agitation durant 12 h. La solution est ensuite évaporée à sec sous vide  
20 et le résidu formé est repris avec 30 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La phase organique est lavée à l'eau (3 x 20 ml), séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée à sec sous vide. La gomme résiduelle est cristallisée dans de l'AcOEt et fournit 73 mg (Rdt = 75%) du composé attendu sous forme de plaquettes incolores.  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9,5 : 0,5) : 0,46.  $F = 153-154$   
25 °C.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -33,7^\circ$  (c 0,8;  $\text{CHCl}_3$ ).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm : 2,02 (s, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ); 2,37, 2,39 (2s, 2 x 3H, 2 x  $\text{SCOCH}_3$ ); 2,93, 3,12 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ); 3,24 (dd,  $J = 7,2$ ; 14,5 Hz, 1H,  $\beta$  Ha cys); 3,31 (dd,  $J = 5,2$ ; 14,5 Hz, 1H,  $\beta$  Hb cys); 3,39-3,49 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ); 4,54 (ddd,  $J = 5,3$ ; 7,2; 7,3 Hz, 1H,  $\alpha$  H cys); 6,44 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H, NH cys); 6,83 (t,  $J = 5,1$  Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ).

SM : (FAB<sup>+</sup>/G-T)  $m/z$  613 (2M+H)<sup>+</sup>, 307 (M+H)<sup>+</sup>.

Analyse :  $C_{11}H_{18}N_2O_4S_2$  (306)

Calc. % : C 43,14 H 5,88 N 9,15 S 20,92

Tr. % : 42,95 5,96 8,93 20,64

5 **2.2. *N*-(*N*-ACETYL-*S*-ISOBUTYRYL-*L*-CYSTEINYL)-*S*-ACETYL  
CYSTEAMINE (I-177)**

- La réaction d'acylation de 85 mg (0,32 mmole) de **I-152** est réalisée, selon la méthode générale précédemment décrite, en utilisant 137  $\mu$ l (1,30 mmole) de chlorure d'isobutyryle à la place de l'anhydride acétique. Le mélange visqueux obtenu, après évaporation à sec sous vide, est ensuite dilué avec 30ml de  $CH_2Cl_2$ . La solution est ensuite lavée (eau, 10 ml; bicarbonate de sodium saturé et glacé, 10 ml; eau, 10 ml; acide citrique 0,1N glacé, 10 ml; eau, 3 x 10 ml), séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée à sec sous vide. Le produit d'acylation est isolé de la gomme obtenue par « flash » chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant :  $CH_2Cl_2$ /éther 50%). On recueille 60 mg (Rdt = 56%) du composé attendu.  $R_f$  ( $CH_2Cl_2$ /MeOH, 9,4 : 0,6) : 0,6. Cristallise dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole sous forme de plaquettes incolores.  $F = 116-118^\circ C$ .  $[\alpha]_D^{20} = -18,4^\circ$  (c 0,87;  $CHCl_3$ ).
- 20 RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  ppm : 1,20 (d,  $J = 6,9$  Hz, 6H,  $C(CH_3)_2$ ; 2,00 (s, 3H,  $NCOCH_3$ ); 2,37 (s, 3H,  $SCOCH_3$ ); 2,80 (hept,  $J = 6,9$  Hz, 1H,  $CH(CH_3)_2$ ; 2,93, 3,12 (m, 2H,  $NCH_2CH_2S$ ); 3,23-3,30 (m, 2H,  $\beta$   $CH_2$  cys); 3,38-3,49 (m, 2H,  $NCH_2CH_2S$ ); 4,46-4,57 (m, 1H,  $\alpha$  H cys); 6,42 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H, NH cys); 6,80 (t,  $J = 5,2$  Hz, 1H,  $NHCH_2$ ).
- 25 SM : (FAB $^+$ /G-T)  $m/z$  669 (2M+H) $^+$ , 335 (M+H) $^+$ .

Analyse :  $C_{13}H_{22}N_2O_4S_2$  (334)

Calc. % : C 46,71 H 6,59 N 8,38 S 19,16

Tr. % : 46,76 6,89 8,24 19,32

30 **2.3. *N*-(*N*-ACETYL-*S*-PIVALOYL-*L*-CYSTEINYL)-*S*-ACETYLCYSTEAMINE (I-178)**

La réaction d'acylation de 95 mg (0,36 mmole) de I-152 est réalisée, selon la méthode générale précédemment décrite, en utilisant 176  $\mu$ l (1,44 mmole) de chlorure de pivaloyle à la place de l'anhydride acétique. Le mélange visqueux obtenu, après évaporation à sec sous vide, est ensuite dilué avec 30 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La solution est ensuite lavée (eau, 10 ml; bicarbonate de sodium saturé et glacé, 10 ml; eau, 10 ml; acide citrique 0,1N glacé, 10 ml; eau, 3 x 10 ml), séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée à sec sous vide. Le produit d'acylation est isolé de la gomme obtenue par « flash » chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /éther 50%). On recueille 70 mg (Rdt = 56%) du composé attendu.  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /éther, 4 : 6) : 0,23. Cristallise dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole sous forme de plaquettes incolores.  $F = 92-94^\circ\text{C}$ .  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -11,1^\circ$  (c 1,08;  $\text{CHCl}_3$ ).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm : 1,25 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ; 2,00 (s, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ); 2,37 (s, 3H,  $\text{SCOCH}_3$ ); 2,94, 3,12 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ); 3,25 (d,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $\beta$   $\text{CH}_2$  cys); 3,38-3,49 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ); 4,51 (td,  $J = 6,5, 7,3$  Hz, 1H,  $\alpha$  H cys); 6,42 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H, NH cys); 6,80 (t,  $J = 5,2$  Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ).

SM : (FAB $^+$ /G-T)  $m/z$  697 ( $2\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 349 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

Analyse :  $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$  (348)

Calc. % : C 48,28 H 6,90 N 8,05 S 18,39

Tr. % : 48,32 6,95 7,94 18,43

### EXEMPLE 3: MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE DES COMPOSES OBTENUS AUX EXEMPLES 1 et 2.

#### 3.1. Préambule

Les manipulations du matériel infectieux ont été réalisées dans un laboratoire de haute sécurité de type L3. De façon à être le plus



proche des conditions physiopathologiques, l'ensemble des études a été mené à l'aide de cultures primaires de MDM, de CMSP ou de LSP obtenus à partir de donneurs de sang sains.

Dans toutes les expériences, les effets des nouvelles molécules ont été comparés à ceux des molécules de référence : NAC, ou MEA.

### **3.2. Isolement, culture et activation des cellules**

#### **3.2.1. Milieux de culture**

Le milieu A est composé de milieu de culture cellulaire RPMI 1640 (Life Technologies) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal (SVF, Boehringer Mannheim) décomplémenté par la chaleur à 56 °C pendant 30 min, de 2 mM de L-Glutamine (Boehringer Mannheim), et d'une solution à 100 µg/ml de 3 antibiotiques (pénicilline, streptomycine, néomycine; PSN, Life Technologies). Le milieu B est constitué de milieu A supplémenté par 20 UI/ml d'IL-2 humaine recombinante (Boehringer Mannheim).

#### **3.2.2 Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique**

Les CMSP sont séparées des autres éléments figurés du sang par centrifugation en gradient de ficoll (MSL 2000, Eurobio) : 30 ml de sang, d'un donneur sain, dilués au tiers sont déposés sur un coussin de 20 ml de ficoll. Après 20 min de centrifugation à 850 g, l'anneau de CMSP est prélevé puis lavé 2 fois dans du RPMI 1640, après 10 min de centrifugation à 750 g et 5 min à 400 g.

#### **3.2.3. Isolement des monocytes et des lymphocytes**

Les monocytes et les lymphocytes sont isolés à partir des CMSP par élutriation à contre-courant selon le protocole décrit par C. Figdor et coll. (*Cell. Biophys.* 1983, 5, 105-118). Les deux populations cellulaires ainsi séparées sont immunophénotypées puis analysées à

l'aide d'un cytomètre en flux (FACScan, Becton Dickinson). La pureté des monocytes et des LSP, ainsi obtenus, est supérieure ou égale à 95%.

#### 5    3.2.4. Culture et activation des cellules

Un million de monocytes, dans 1 ml de milieu de culture A, sont répartis dans chaque puits d'une plaque de 48 puits (Becton-Dickinson). Les monocytes sont laissés à différencier en macrophages pendant 7 jours. Les macrophages ainsi différenciés sont maintenus en culture dans du milieu A.

Pour certaines expériences, les CMSP ainsi que les LSP sont activés pendant 48 h par 1 µg/ml d'un mitogène, la PHA-P (Difco Laboratories). Les CMSP et les LSP sont cultivés en milieu A (quiescentes) ou B (activées). Les cellules sont cultivées à 37 °C, en atmosphère saturée en humidité, sous 5% de CO<sub>2</sub>. Les surnageants de culture sont prélevés, et les milieux de culture sont renouvelés tous les trois ou quatre jours. A chaque renouvellement des milieux de culture, la viabilité cellulaire est évaluée par une coloration au bleu Trypan ou par une observation microscopique.

20

### **3.3. Evaluation de l'activité antivirale de la I-152 et de ses dérivés**

#### 3.3.1. Préparation des composés

Lors de la première série d'évaluation de l'activité antivirale et lors de l'étude du mécanisme d'action de la I-152, la I-152 et les produits de référence ont été solubilisés dans le milieu A. Les molécules ont été resuspendues à des concentrations stock (NAC : 20 mM, MEA et I-152 : 10 mM) et ont été conservées à -80°C. Les dilutions ont ensuite été préparées extemporanément dans du milieu A.

Lors de la deuxième série d'évaluation de l'activité antivirale, la I-152 et ses dérivés (insolubles dans le milieu A), ont été solubilisés dans

le DMSO puis dilués dans du milieu A. La concentration en DMSO au cours de cette étude est de 1,5%. Les solutions et les dilutions ont été réalisées extemporanément afin d'éviter ou de réduire l'oxydation de la I-152, par le DMSO, en son disulfure.

5

### 3.3.2. Virus et infection des cellules

Les MDM ont été infectés par l'isolat de référence à tropisme macrophagique, VIH-1/Ba-L. Les CMSP et les LSP ont été infectés par l'isolat de référence à tropisme lymphocytaire VIH-1-LAI. Les stock  
10 viraux ont été constitués en amplifiant *in vitro* ces souches à l'aide de cellules mononucléées du sang ombilical (CMSO) activées préalablement par 1 µg/ml de PHA-P et cultivées dans du milieu A supplémenté par 20 UI/ml d'IL-2. Afin d'éliminer les facteurs solubles tels que les cytokines, les surnageants de culture ont été  
15 ultracentrifugés à 360 000 g pendant 5 min, et les culots ont été resuspendus dans du RPMI 1640. Les stocks viraux ainsi constitués ont été ensuite titrés à l'aide de CMSP activées par la PHA-P. Les TCID<sub>50</sub> (50% Tissue Culture Infectious Dose) ont été calculées en utilisant la formule de Kärber.

20 Un million de MDM ont été infectés par 10 000 TCID<sub>50</sub> de la souche VIH-1/Ba-L. Cette quantité de virus correspond à une multiplicité d'infection (m.o.i.) égale à 0,01. L'excès de virus est éliminé 24 h après, en lavant les cellules à l'aide de RPMI 1640. Les LSP et les CMSP ont été infectés par 10 000 TCID<sub>50</sub> de la souche VIH-1-LAI (moi =  
25 0,01). Les cellules sont lavées au terme du deuxième jour d'infection.

### 3.3.3. Dosage de la réplication virale dans les surnageants de culture

#### 3.3.3.1 Dosage de l'activité transcriptase inverse (TI)

La réplication virale est mesurée par le dosage de l'activité TI dans  
30 les surnageants de culture selon la technique décrite par F. Rey et coll. (*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1984, 121, 126-133). La radioactivité

incorporée lors de l'élongation du brin complémentaire d'une matrice synthétique poly-rA en présence d'une amorce oligo-dT<sub>12-18</sub> et d'un substrat radiomarké, la [<sup>3</sup>H-méthyl]thymidine-5'-triphosphate ([<sup>3</sup>H]TTP), permet de doser l'activité enzymatique de la TI. 400 µl de surnageant sont ultracentrifugés à 360 000 g pendant 5 min. La TI est libérée par la lyse du culot viral dans 20 µl de NTE-Triton (NaCl 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,1%). Ces 20 µl sont ensuite incubés avec 40 µl du mélange réactionnel suivant : Tris 62,5 mM, pH 7,8; KCl 25 mM; MgCl<sub>2</sub> 6,25 mM; dithiothréitol (DTT) 1,25 mM; poly-rA et oligo-dT<sub>12-18</sub> 2,5 x 10<sup>-3</sup> UDO, [<sup>3</sup>H]TTP 5,55 x 10<sup>-3</sup> TBq. Au bout d'une heure à 37 °C, la réaction enzymatique est arrêtée, et les brins néosynthétisés sont précipités pendant 20 min à 4 °C par l'ajout de 1 ml de pyrophosphate de sodium (PPNa), de 50 µl d'ADN de levure (0,1 mg/ml en acide trichloroacétique (TCA) 5%), et de 4 ml de TCA 20%. Le mélange est filtré au moyen d'une membrane d'acétate de cellulose (Millipore) qui retient les chaînes poly-dT radiomarkées. Le filtre est lavé à l'aide de 20 ml de TCA 5%, l'eau résiduelle est éliminée par ajout de 25 µl d'éthanol à 70%. Le filtre est séché à l'étuve pendant 10 minutes à 80 °C puis est introduit dans des fioles contenant 8 ml de liquide scintillant. La radioactivité β est quantifiée au moyen d'un compteur à scintillation (Packard Bell). Les résultats sont exprimés en pM de [<sup>3</sup>H]-TMP incorporées/h/ml de surnageant ou, plus simplement, en cpm/h/ml.

### 3.3.3.2 Dosage de la protéine P25

Le dosage de la protéine p25 est effectué à l'aide de la trousse ELISA de DuPont de Nemours. 200 µl du surnageant de culture à tester sont placés dans un puits d'une plaque de microtitration. L'ajout de 20 µl de tampon de lyse libère les protéines virales dans le milieu. L'antigène libéré se fixe à un anticorps monoclonal de souris anti-p25 immobilisé au fond des puits. Après incubation de 2 h à 37 °C, 3

lavages à l'aide de 5 ml de tampon de lavage sont réalisés puis 100 µl d'un anticorps polyclonal biotinylé réagissant avec l'antigène immobilisé sont incubés pendant 1 h à 37 °C. Une série de 3 lavages dans le même tampon et avec le même volume est de nouveau effectuée avant l'ajout  
5 pendant 15 mn à 37 °C de 100 µl de conjugué peroxydase de Raifort-streptavidine qui permettra d'amplifier la réaction colorimétrique. Le complexe formé est révélé, après 3 lavages à l'aide de 5 ml du tampon de lavage de la trousse, par 100 µl de dichlorhydrate d'op-phénylènediamine (OPD). Au terme de 30 min d'incubation à la  
10 température ambiante, la réaction est arrêtée par l'ajout de 100 µl d'acide sulfurique 4N. La DO de la coloration ainsi obtenue est lue à 490 nm. Cette absorbance est directement proportionnelle à la quantité d'antigène fixé. La relation linéaire liant la D.O. à la concentration de p25 est établie grâce à une gamme étalon réalisée à partir d'une  
15 solution de p25 recombinante.

#### 3.3.4. Analyse des résultats et détermination des doses effectrices 50%

Les doses effectrices 50% (DE50) sont calculées à partir des activités TI cumulées en utilisant le logiciel "Dose-effects analysis with  
20 microcomputers" mis au point par J. Chou & T.C. Chou.

#### 3.3.5. Mesure de la viabilité cellulaire

Ces tests sont systématiquement menés en parallèle de l'évaluation de l'activité antivirale. Compte-tenu du pouvoir oxydo-  
25 réducteur des molécules testées, le test au sel de tétrazolium, mesurant l'activité des déshydrogénases mitochondriales n'a pu être utilisé.

##### *3.3.5.1. Mesure à l'aide d'un colorant d'exclusion, le bleu Trypan*

Les cellules non adhérentes, comme les CMSP et les LSP, sont  
30 numérées à l'aide d'une cellule de Malassez et d'un colorant d'exclusion, le bleu Trypan (BT). 25 µl de la suspension cellulaire sont

ajoutés à 475 µl de BT. Cette numération est effectuée après l'isolement des CMSP et des LSP, avant la mise en plaque, et à chaque renouvellement du milieu de culture.

#### 5 3.3.5.2. Mesure à l'aide d'un colorant vital, le rouge neutre

Le rouge neutre (RN) est un colorant vital qui permet de mesurer la viabilité des cellules adhérentes comme les MDM. 600 µl de surnageant de culture sont éliminés et remplacés par 400 µl d'une solution de RN (0,001% m/v dans du tampon phosphate, PBS, 10 Boehringer Mannheim), filtrée à 0,45 µm. Les cellules sont incubées 1 h à 37 ° C, et sont ensuite lavées (2 x 1 ml de PBS). Les cellules sont alors lysées à -20 °C avec 200 µl d'un mélange d'éthanol à 50% contenant 1% d'acide acétique glacial. La DO est mesurée deux fois sur 100 µl de solution à l'aide d'un spectrophotomètre.

15

### 3.4. Etude du mécanisme d'action de la I-152

#### 3.4.1. Quantification des ADN proviraux par PCR

La I-152 est constituée de MEA et de NAC qui sont susceptibles 20 d'interagir avec les phases précoces du cycle biologique du VIH. A ce titre, elle est capable de diminuer l'intégration du provirus au sein du génome cellulaire. Afin de mesurer ces effets, les ADN proviraux ont été quantifiés par PCR. Les cellules ont été lysées à l'aide de 1 ml de la solution de lyse suivante: 10 mM de Tris HCl pH 8; 100 mM d'EDTA pH 25 8; 0,5% de dodecyl sulfate de sodium (SDS); 20 µg/ml de RNase pancréatique bovine DNase-free. 200 µg/ml de protéinase K sont ensuite ajoutés à cette suspension. Les ADN ont été ensuite extraits à l'aide de 1 ml d'une solution saturée et glacée de phénol, et de 1 ml d'une solution de phénol/Chisam.

30 Les ADN viraux ont alors été amplifiés au moyen d'amorces spécifiques du gène *gag* (SK01/SK39) et d'une gamme étalon de la

lignée 8E5, lignée chroniquement infectée dont les cellules sont porteuses d'une copie provirale. Le gène de la  $\beta$ -globine a été utilisé comme gène rapporteur afin de s'assurer de la qualité de l'extraction d'ADN.

5

#### 3.4.2. Test acellulaire de l'activité enzymatique de la TI

La molécule I-152 est constituée de NAC et de MEA qui sont susceptibles d'inhiber l'activité de la TI (A. Bergamini et coll. *J. Clin. Invest.* 1994, 93, 2251-2257). De ce fait, le pouvoir inhibiteur de la I-152 vis à vis de l'activité TI a été mesuré à l'aide d'un test acellulaire. Ce test a été réalisé selon le protocole décrit précédemment (§ 3.3.3.1.). Dans le mélange réactionnel, seuls les 20  $\mu$ l d'eau sont remplacés par 20  $\mu$ l d'une concentration de I-152 ou des composés de référence. L'héparine, connue pour inhiber l'activité de la TI et des autres ADN polymérases, est utilisée comme contrôle positif d'inhibition.

15

#### 3.4.3. Dosage du glutathion total

La méthode de dosage du glutathion (GSH + GSSG) que nous avons utilisée est une adaptation, au système de culture de MDM, de celle décrite par O.W. Griffith et coll. (*Anal Biochem.* 1980, 106, 207-212). Les dosages ont été réalisés 24 h après le début du traitement par les différents composés. Un million de cellules sont lavées trois fois en PBS, puis lysées par 150  $\mu$ l d'un tampon de lyse (Phosphate 0,1 M pH = 7,4; NaCl 0,15 M; BSA 0,1%; Azide 0,01%; Triton X-100 0,1%; acide 5'-sulfosalicylique 0,05%). La gamme étalon de raison deux s'échelonne de 50  $\mu$ M à 1,5 nM de GSSG ou de GSH. Le test est réalisé en triplicat. 85  $\mu$ l de 0,6 mM de NADPH, 25  $\mu$ l de 6 mM de DTNB, et 130  $\mu$ l d'eau pure sont rajoutés dans les échantillons. Ces derniers sont incubés à 30°C pendant 10 min. Au moment de la lecture, 20  $\mu$ l de GSSG réductase à 1 U/ml sont ajoutés dans tous les puits. L'absorbance est mesurée au long cours à 412 nm. La concentration en glutathion total est ensuite

30

déterminée par rapport aux valeurs de la courbe d'étalonnage, réalisée en parallèle du dosage, et par l'extrapolation au niveau de la partie linéaire de la courbe.

#### 5 **EXEMPLE 4: ACTIVITE ANTI-VIH DE LA I-152 VIS-A-VIS DES MACROPHAGES**

##### **4.1. Activité antivirale de la I-152 vis-à-vis de MDM infect's extemporanément**

10

##### 4.1.1. Doses effectrices 50, 70 et 90% et cytotoxicité de la I-152

Les cellules de la lignée macrophagique jouent un rôle majeur dans les « process » oxydatifs. La molécule pro-GSH, I-152, a donc été testée vis-à-vis de MDM infectés par la souche VIH-1/Ba-L. La I-152  
15 après métabolisation intracellulaire est susceptible de libérer de la NAC, de la MEA et de la cystéine (figure 1).

Nous avons comparé les activités de la I-152 à celles de ses deux composantes, la NAC et la MEA, dans notre système expérimental. La I-152 possède une forte activité antivirale, supérieure à celle de la NAC  
20 ou de la MEA (Figure 2, Tableau I). Les concentrations inhibitrices de la NAC, de la MEA, et de la I-152 sont respectivement égales à 9,4 mM; 300 µM et 50 µM. A la vue de ces chiffres, la I-152 apparaît donc 6 et 188 fois plus efficace que la MEA et la NAC. Toutefois, ces valeurs ne reflètent pas l'écart entre ces trois produits. En effet, aux doses  
25 antivirales, la NAC et la MEA sont cytotoxiques alors que la I-152 ne l'est pas. Ainsi, la NAC est cytotoxique dès 10 ou 15 mM (Figure 3 : NAC 15 mM : 70% de cytotoxicité; NAC 40 mM : 91%), et la MEA diminue la viabilité des MDM de 65% à la concentration de 500 µM (Figure 3). En revanche, la I-152 même à des doses 10 fois supérieures à sa dose  
30 effectrice (DE) 50% n'est pas cytotoxique (Figure 3: 500 µM).



#### 4.1.1.2. Effet de la I-152 sur la production de la protéine majeure de la nucléocapside virale

La réplication virale peut être mesurée dans les surnageants de culture en dosant soit l'activité enzymatique de la TI soit la protéine majeure de la nucléocapside virale, p25. Dans les cultures de MDM infectés, l'inhibition de la production de la protéine p25 est concomitante de celle de l'activité TI (Figure 4). Ces résultats confirment donc l'efficacité antivirale de la I-152.

#### 10 4.1.1.3. Effet de la multiplicité d'infection sur l'activité antivirale de la I-152

Au cours de nos premières expériences, les cellules étaient infectées à l'aide de 10 000 TCID<sub>50</sub> (m.o.i. : 0,01). Afin de mesurer les effets de la charge virale sur l'activité anti-VIH de la I-152, les cellules ont été infectées, dans un second temps, à l'aide de 1 000 TCID<sub>50</sub> (m.o.i. : 0,001).

L'activité antivirale de la I-152 augmente lorsque la m.o.i. est diminuée (Figure 5), et la DE s'en trouve diminuée (Tableau II, 3  $\mu$ M vs. 50  $\mu$ M).

20

#### 4.1.2. Activité antivirale de la I-152 vis-à-vis de MDM préalablement infectés

Le traitement des cellules 7 jours après l'infection, confirme l'activité antivirale de la I-152 (Figure 6). En effet, à la dose de 500  $\mu$ M, la réplication virale est éteinte. Toutefois, dans ces conditions expérimentales, la dose de 250  $\mu$ M est inefficace. Ce décalage du potentiel inhibiteur, observé entre les différents modes de traitement, suggère 1) que la I-152 inhibe la réplication virale en associant probablement deux mécanismes : un précoce et un tardif, et 2) qu'à forte dose ( $\geq$  500  $\mu$ M), l'inhibition de la phase tardive du cycle biologique est suffisante.

30

#### **4.2. Activité antivirale de la I-152 dans des cultures primaires de lymphocytes et de cellules mononucléées du sang périphérique**

5       Après avoir montré l'activité antivirale de la I-152 vis-à-vis des cellules de la lignée macrophagique, ses effets ont été mesurés vis-à-vis de lymphocytes du sang périphérique (LSP) et d'une population mixte contenant des monocytes/macrophages et des lymphocytes, les CMSP. De plus, afin de mesurer les effets de l'activation cellulaire sur l'activité  
10   antivirale de la I-152, les cellules ont été ou non activées par un mitogène, la phytohémagglutinine-P (PHA-P).

##### **4.2.1. Viabilité des CMSP et des LSP traités par la I-152**

      La viabilité cellulaire a été mesurée en parallèle à l'estimation de  
15   l'activité antivirale. A chaque renouvellement du milieu de culture, les cellules viables ont été numérées au moyen d'un colorant d'exclusion, le Bleu Trypan. Dans les cultures de CMSP et de LSP, la I-152 n'est pas cytotoxique. En effet, la viabilité des lymphocytes n'est pas diminuée dans les cultures de LSP et de CMSP, et, d'autre part dans ces  
20   dernières, lorsque les cellules ne sont pas exposées à la PHA-P, les monocytes se différencient en macrophages avec un aspect pseudofibroblastique. En revanche, la NAC et la MEA sont cytotoxiques pour les deux types cellulaires dès les doses de 10 ou 15 mM et 500  $\mu$ M, respectivement.

25

##### **4.2.2 Activité antivirale de la I-152 vis-à-vis de CMSP quiescentes ou activées par la PHA-P, et infectées**

      Les CMSP, quiescentes ou activées par la PHA-P, ont été infectées par la souche de référence à tropisme lymphocytaire VIH-1-LAI. Toutes  
30   les cultures ont été menées en parallèle, et les drogues ont été maintenues tout au long de la culture.

Dans les deux populations cellulaires, la MEA et la NAC n'inhibent pas la réplication virale, aux doses non cytotoxiques (Résultats non présentés). Dans les CMSP quiescentes, la I-152 inhibe la réplication virale de 97 et 88%, respectivement aux doses de 250 et 125  $\mu$ M et, dans les CMSP activées, la réplication virale est diminuée de 42 et 25% aux mêmes doses (Figure 7).

#### 4.2.3. Activité antivirale de la I-152 vis-à-vis de LSP quiescents ou activés par la PHA-P, et infectés par la souche VIH-1-LAI

Comme dans les cultures de CMSP, la MEA et la NAC n'ont pas ou peu d'activité antivirale dans les LSP (Résultats non présentés). En revanche, la I-152 inhibe la réplication virale dans les LSP quiescents ou activés par la PHA-P (Figure 8).

### **4.3. Mécanisme d'action de la I-152**

#### 4.3.1. Effet de la I-152 sur l'intégration du génome proviral au sein du génome cellulaire

Les expériences de culture cellulaire suggéraient que la I-152 inhibait la réplication du VIH en associant probablement deux mécanismes, l'un précoce et l'autre tardif. Afin de mesurer les effets de cette molécule sur les phases précoces du cycle biologique du VIH, l'intégration du provirus au sein du génome cellulaire a été quantifiée par PCR. La I-152 inhibe l'intégration du provirus. Cette inhibition est largement supérieure à celle induite par la NAC ou la MEA. En revanche, elle n'est pas totale à la différence de celle induite par 10  $\mu$ M d'AZT (Figure 9).

#### 4.3.2. Effet de la I-152 sur l'activité enzymatique de la TI dans un système acellulaire

Manuscrit de la thèse de doctorat de M. A. L. 2014

Compte-tenu des résultats précédents et parce que la MEA est susceptible d'inhiber l'activité de la TI, les effets de la I-152 sur l'activité de cette enzyme ont été mesurés dans un système acellulaire. L'expérience a été doublée, et l'héparine a été utilisée comme témoin de l'inhibition de l'activité de la TI. Dans les deux cas, l'héparine à la concentration de 1 mg/ml inhibe totalement l'activité TI de l'isolat VIH-1-LAI. Cette inhibition est dose-dépendante. De même, la MEA diminue de  $29 \pm 1\%$  (Exp. 1, Figure 10) et  $48 \pm 4\%$  (Exp. 2 non présentée) à la dose de 500  $\mu\text{M}$ . En revanche, la NAC et la I-152 ne présentent pas d'activité inhibitrice vis-à-vis de la TI du VIH dans notre système expérimental (Figure 10). Ces résultats confirment que la I-152, en libérant la MEA, peut interagir avec une étape précoce du cycle biologique du VIH.

#### 4.3.3. Effet de la I-152 sur la concentration intracellulaire du glutathion

Les effets tardifs de la I-152 sont probablement la conséquence plus directe de son activité pro-glutathion. Afin de s'assurer de cette activité dans les lymphocytes et les macrophages, les concentrations intracellulaires de glutathion total (GSH + GSSG) ont été déterminées dans les cultures de CMSP (Figure 11). Des deux molécules de référence, la NAC possède la meilleure capacité à augmenter le taux intracellulaire de glutathion dans les CMSP quiescentes. En effet, la MEA ne module pas significativement le taux intracellulaire de glutathion, tout du moins aux doses testées. Dans nos expériences, les doses utilisées de NAC sont plus élevées que celles de MEA, ceci peut expliquer la différence observée dans le taux intracellulaire de glutathion.

La I-152 augmente le taux intracellulaire de glutathion. Cette augmentation suit une courbe en cloche avec un optimum à 25 et 125  $\mu\text{M}$ . La dose de 125  $\mu\text{M}$  de I-152 augmente la concentration cellulaire jusqu'à  $2,64 \pm 0,13 \mu\text{M}$ . Cette concentration intracellulaire est

équivalente à celle obtenue avec la dose de 15 mM de NAC. En considérant les concentrations de molécules supplémentant le milieu de culture, la I-152 est 120 fois plus active que la NAC. Il est à noter que les concentrations intracellulaires de glutathion diminuent aux fortes concentrations, tout du moins pour la MEA (500  $\mu$ M) et la I-152 (250  $\mu$ M). Ce phénomène est probablement la conséquence des processus de régulation du glutathion.

#### **4.4. Activité antivirale des dérivés S-acylés de la I-152: I-176, I-177, I-178 vis-à-vis des MDM infectés extemporanément**

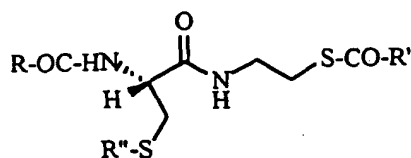
Lors d'une deuxième série d'expériences, les activités antirétrovirales des dérivés de la I-152 ont été testées vis-à-vis des MDM infectés par la souche VIH-1/Ba-L (Figure 12). Ces molécules sont lipophiles et ont donc été solubilisées dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) puis diluées. La I-152, servant de référence, a été traitée de la même façon. Dans ces conditions expérimentales, la I-152 s'est avérée la plus efficace à inhiber la réplication virale. Toutefois, il est à noter que le DMSO diminue son efficacité antivirale, et que l'écart type est important car l'activité antivirale a été diminuée sur deux des trois puits du triplicat de culture. Le composé I-176 est légèrement toxique à 150  $\mu$ M, ceci peut expliquer aussi la variabilité au sein du triplicat de culture et la taille de l'écart-type observé. A ce jour, aucun des dérivés S-acylés n'a montré, *in vitro*, une activité supérieure à celle de la molécule mère. Néanmoins, les I-177 et 178 ont des activités proches de la I-152 et, compte-tenu de l'importance de cette dernière, ces deux molécules, plus lipophiles, sont à retenir. Elles peuvent présenter des avantages dans le cas d'expérimentations cliniques. En effet, elles sont susceptibles d'avoir des formes galéniques et des modes d'administrations différents de ceux de la I-152.

**REFERENCES**

- Abrams, 1991, Am. J. Med., 91, 106-112.
- 5 Barnett et al., 1969, J. Amer. Chem. Soc., 91, 2358-2369.
- Bergamini et al., 1994, J. Clin. Invest., 93, 2251-2257.
- Bosegaard et al., 1993, J. Pharmacol. Exp. Ther. 265, 1239-1244.
- 10 Figdor et al., 1983, Cell. Biophys., 5, 105-118.
- Griffith et al., 1980, Anal Biochem., 106, 207-212.
- 15 Heller et al., 1997, Advances in Pharmacology, 38, 629-638.
- Herzenberg et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci., 94, 1967-1972.
- Horowitz, 1991, Am. J. Med., 91, 113-117.
- 20 Rabinovitch et al., 1992, Diabetologie, 35, 409-413.
- Rey et al., 1984, Biochem. Biophys. Res. Comm., 121, 126-133.
- 25 Volante, 1981, Tetrahedron Lett., 22, 3119-3122.
- Wieland et Bokelman, 1952, Ann. Chem. 576 : 20-34

# REVENDECATIONS

5 1/ Composés de formule générale:



(I)

dans laquelle :

- R et R' représentent indépendamment un radical alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>,  
 10 linéaire ou ramifié, ou un groupe aryle non substitué ou substitué  
 par un ou plusieurs radicaux choisis parmi les halogènes, les  
 radicaux alkyles en C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> linéaires ou ramifiés, et les radicaux -OH ;
- R'' est l'hydrogène ou un groupe CO-R<sup>1</sup> dans lequel R<sup>1</sup> est un radical  
 15 alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> linéaire ou ramifié, ou un groupe aryle non substitué  
 ou substitué par un ou plusieurs radicaux choisis parmi les  
 halogènes, les radicaux alkyles en C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> linéaires ou ramifiés, et les  
 radicaux -OH ;

ainsi que les dimères formés par un pont disulfure à partir de l'un  
 et/ou l'autre des deux atomes de soufre des composés de formule  
 20 générale I constitué par les radicaux R'' ou par les radicaux R'CO- des  
 deux molécules ainsi que les formes thiazolidines correspondantes.

2/ Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que R et R'  
 sont des groupes méthyles (-CH<sub>3</sub>).

25

3/ Composé selon la revendication 2 caractérisé en ce que R'' est  
 l'hydrogène (Composé N-(N-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine).

4/ Composé selon la revendication 2 caractérisé en ce que R'' est un groupe acétyle ( $-\text{COCH}_3$ ) (Composé N-(N,S-Bis-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine).

5

5/ Composé selon la revendication 2 caractérisé en ce que R'' est un groupe isobutyryle ( $-\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ ) (Composé N-(N-acétyl-S-isobutyryl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine).

10 6/ Composé selon la revendication 2 caractérisé en ce que R'' est un groupe pivaloyl ( $-\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ) (Composé N-(N-acétyl-S-pivaloyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine).

15 7/ Procédé de préparation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- a) Protection de la N-acyl-L-cystéine pour fournir le composé N-acyl-S-trityl-L-cystéine (7) ; puis
- b) Couplage de la N-acyl-S-trityl-L-cystéine protégée (7) avec le  
20 chlorhydrate de S-acylcystéamine pour fournir le composé N-(N-acyl-S-trityl-L-cystéinyl)-S-acylcystéamine (8); puis
- c) Déprotection du composé (8); puis
- d) Libération du thiol libre de formule I.

25 8/ Procédé de préparation d'un composé selon la revendication 1 dans lequel  $R = R'$  et R'' est un hydrogène et caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- b) Estérification de la fonction carboxylique de la N-Boc-L-sérine (1) par la N-hydroxysuccinimide dans du N, N-diméthylformamide (DMF) en  
30 présence de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) pour former l'ester actif (1'); puis,



- e) Condensation *in situ* de l'ester actif formé (1') avec l'éthanolamine (2) pour fournir le composé N-(N-Boc-L-séryl)-2-aminoéthanol (3); puis,
- f) Réaction de Mitsunobu sur le composé (3) avec de la triphénylphosphine et du diisopropyl azodicarboxylate en présence  
5 d'acide thiocarboxylique dans le tétrahydrofurane pour fournir le composé N-(N-Boc-S-acyl-L-cystéinyl)-S-acylcystéamine (4); puis,
- g) Déprotection du composé (4) avec l'acide trifluoroacétique.

9/ Procédé selon la revendication 7 pour la préparation du composé  
10 selon la revendication 3 caractérisé en ce que le composé N-acyl-S-trityl-L-cystéine de l'étape a) est le composé N-acétyl-S-trityl-L-cystéine et que le chlorhydrate de S-acylcystéamine de l'étape b) est le chlorhydrate de S-acétylcystéamine.

15 10/ Procédé selon la revendication 8 pour la préparation du composé selon la revendication 3 caractérisé en ce que l'acide thiocarboxylique de l'étape c) est l'acide thioacétique.

11/ Procédé de préparation des composés selon la-revendication 2 par  
20 S-acylation du composé de la revendication 3 en solution dans la pyridine en présence d'un anhydride  $R_2O$  ou d'un chlorure d'acide  $R-Cl$  caractérisé en ce que R est choisi dans le groupe  $CO-R^1$  dans lequel  $R^1$  est un radical alkyle en C1-C7, linéaire ou ramifié ou un groupe aryle substitué ou non par un ou plusieurs atomes d'halogènes.

25

12/ Procédé de préparation du composé selon la revendication 4 par S-acylation du composé de la revendication 3 en solution dans la pyridine en présence d'anhydride acétique.

PROTECTOR

- 13/ Procédé de préparation du composé selon la revendication 5 par S-acylation du composé de la revendication 3 en solution dans la pyridine en présence de chlorure d'isobutyryle.
- 5 14/ Procédé de préparation du composé selon la revendication 6 par S-acylation du composé de la revendication 3 en solution dans la pyridine en présence de chlorure de pivaloyle.
- 10 15/ Précurseur d'un composé intervenant dans la voie de biosynthèse du glutathion caractérisé en ce qu'il s'agit d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.
- 15 16/ Utilisation des composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour la préparation d'un produit intervenant dans la voie de biosynthèse du glutathion.
- 20 17/ Utilisation selon la revendication 16 caractérisée en ce que ledit produit est choisi dans le groupe formé par la N-acétyl-L-cystéine, la cystéamine, la L-cystéine.
- 18/ Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 en tant qu'agent antioxydant.
- 25 19/ Composé selon l'une des revendications 1 à 6 à titre de médicament.
- 20/ Composé selon l'une des revendications 1 à 6 à titre de médicament destiné à augmenter le taux intracellulaire et/ou extracellulaire de glutathion.

- 21/ Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour la préparation de médicament destiné à augmenter le taux intracellulaire et/ou extracellulaire de glutathion.
- 5 22/ Composition pharmaceutique, notamment dermatologique, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité efficace d'un composé selon l'une des revendications 1 à 6 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 10 23/ Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 6 pour la préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique selon la revendication 22 pour le traitement et/ou la prévention de pathologies ou de troubles liés à une déplétion en glutathion intra et/ou extracellulaire.
- 15 24/ Utilisation selon la revendication 23 caractérisée en ce que lesdites pathologies sont choisies parmi les infections virales, les infections bactériennes, les infections parasitaires, les maladies du tractus respiratoire, les maladies neurodégénératives, les maladies auto-  
20 immunes, les maladies cardio-vasculaires, les cancers, les maladies du système immunitaire, le diabète, et de préférence le diabète de type I, les pathologies ophtalmiques, les maladies dermatologiques.
- 25 25/ Utilisation selon la revendication 24 caractérisée en ce que lesdites pathologies sont les infections virales.
- 30 26/ Utilisation selon la revendication 25 caractérisée en ce que lesdites infections virales sont des infections causées par les virus à ADN et les virus à ARN, plus particulièrement par les virus rétroïdes, plus particulièrement le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et de

manière préférée le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1).

27/ Utilisation selon la revendication 25 caractérisée en ce que ledit  
5 composé est le composé selon la revendication 3.

28/ Utilisation selon la revendication 25 caractérisée en ce que ledit  
composé est le composé selon l'une des revendications 4 à 6.

10 29/ Composition pharmaceutique pour le traitement préventif et curatif  
du SIDA et des atteintes tissulaires associées caractérisée en ce qu'elle  
contient une quantité thérapeutiquement efficace d'un composé selon  
les revendications 1 à 6 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

15 30/Produit comprenant au moins un composé selon l'une des  
revendications 1 à 6 et au moins un inhibiteur de la transcriptase  
inverse comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée,  
séparée ou étalée dans le temps en thérapie antivirale.

20 31/ Produit selon la revendication 30, caractérisée en ce que ledit  
inhibiteur de la transcriptase inverse est choisi par exemple parmi le 3'-  
azido-3'désoxythymidine (AZT), le 2',3'-didésoxyinosine (ddI), le 2',3'-  
didésoxycytidine (ddC), le (-)2',3'-didésoxy-3'-thiacytidine (3TC), le 2',3'-  
didéshydro-2',3'didésoxythymidine (d4T) et le (-)2'-désoxy-5-fluoro-3'-  
25 thiacytidine (FTC), le TIBO, le HEPT, le TSAO, l' $\alpha$ -APA, la névirapine, le  
BAHP, l'acide phosphonoformique (PFA).

32/ Utilisation selon la revendication 23 caractérisée en ce que lesdites  
pathologies sont des maladies cardio-vasculaires choisies de préférence  
30 parmi le groupe composé de l'hypertension artérielle, de  
l'artériosclérose, des ischémies cérébrales, des ischémies cardiaques,

des arythmies ventriculaires, des fibrillations ventriculaires, de l'infarctus du myocarde.

33/ Utilisation selon la revendication 23 caractérisée en ce que lesdites  
5 pathologies sont les pathologies ophtalmiques, notamment la cataracte.

34/ Utilisation selon la revendication 23 caractérisée en ce que lesdites  
pathologies sont des maladies du tractus respiratoire, notamment  
l'emphysème pulmonaire, la fibrose pulmonaire idiopathique, la  
10 mucoviscidose, la bronchite chronique, la bronchite aiguë, le syndrome  
de détresse respiratoire de l'adulte.

35/ Utilisation d'un composé selon l'une quelconques des  
revendications 1 à 6 pour la préparation d'un médicament ou d'une  
15 composition pharmaceutique selon la revendication 22 destinés au  
traitement préventif et/ou curatif des pertes auditives liées au bruit.

36/ Utilisation d'un composé selon l'une quelconques des  
revendications 1 à 6 pour la préparation d'un médicament ou d'une  
20 composition pharmaceutique selon la revendication 22 destinés au  
traitement des empoisonnements liés à l'administration par voie orale  
ou parentérale, en surdose ou non, de substances choisies de  
préférence parmi le groupe composé de l'acétaminophène, les nitrites,  
l'éthanol, l'acrylonitrile, les métaux lourds et plus particulièrement l'or,  
25 l'argent, le mercure.

37/ utilisation selon la revendication 18 d'un composé selon l'une des  
revendications 1 à 6 dans le domaine de la cosmétique.

30 38/ Utilisation selon la revendication 37 pour:

(i) prévenir, effacer et traiter les rides, les ridules de la peau; et/ou



- (ii) lutter contre le relâchement cutané et/ou sous cutané; et/ou
- (iii) améliorer la texture de la peau et raviver l'éclat de la peau; et/ou
- (iv) éliminer les poils indésirés de la peau; et/ou
- (v) diminuer les tailles des pores de la peau; et/ou
- 5 (vi) déformer en permanence les cheveux.

39/ Composition cosmétique pour le traitement de la peau et/ou des  
cheveux et/ou des poils caractérisée en ce qu'elle contient un composé  
selon l'une des revendications 1 à 6 et un excipient cosmétiquement  
10 acceptable.

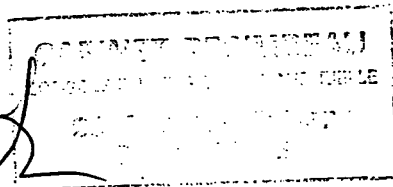
40/ Procédé de traitement cosmétique de la peau pour prévenir, effacer  
et traiter les rides, les ridules de la peau et/ou lutter contre le  
relâchement cutané et/ou sous cutané et/ou améliorer la texture de la  
15 peau et raviver l'éclat de la peau et/ou éliminer les poils indésirés de la  
peau et/ou diminuer les tailles des pores de la peau comprenant  
l'application sur la peau d'une composition cosmétique selon la  
revendication 39.

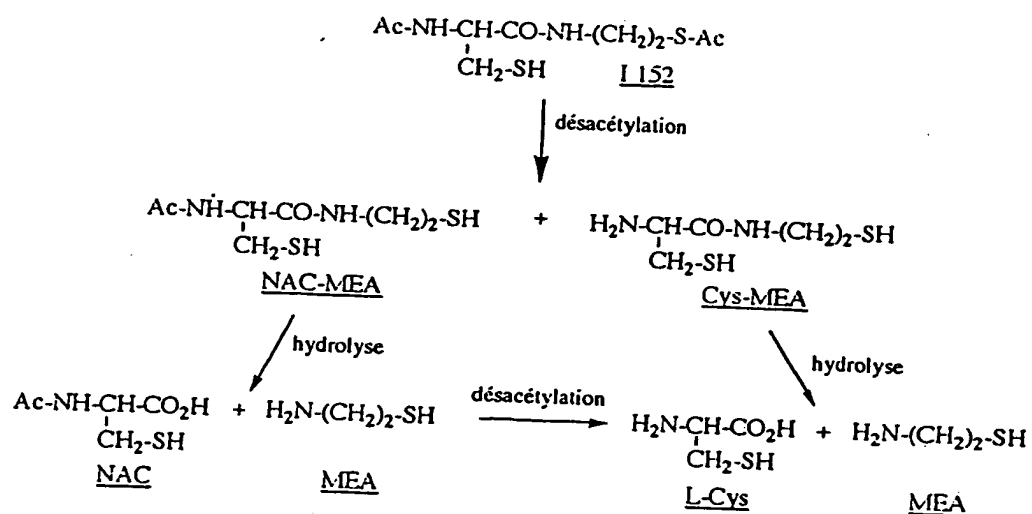
20 41/ Procédé de traitement cosmétique des cheveux pour la déformation  
permanente des cheveux, comprenant l'application sur les cheveux  
d'une composition cosmétique selon la revendication 39.

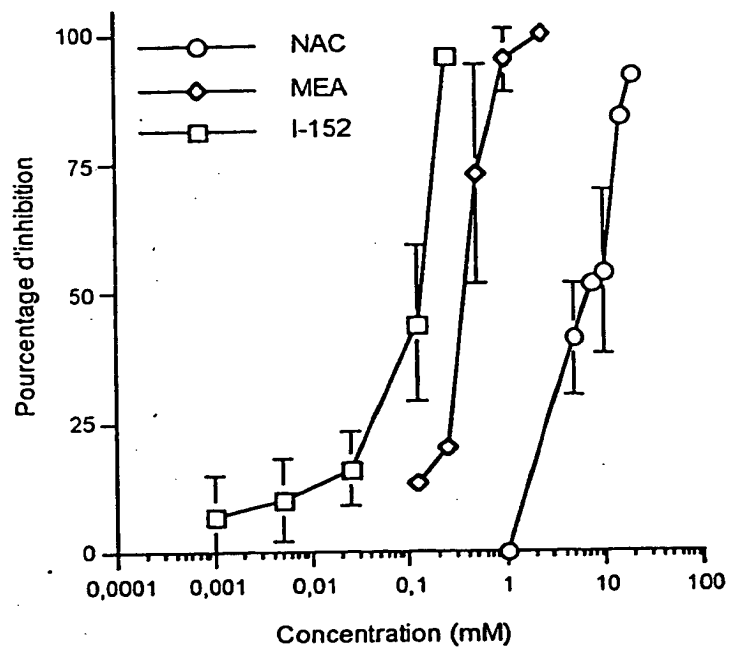
25 42/ Utilisation selon la revendication 18 dans l'industrie  
agroalimentaire et notamment pour la conservation des propriétés  
organoleptiques et nutritionnelles des boissons notamment des jus de  
fruit et/ou des aliments.

ORIGINAL

*(Handwritten signature)*



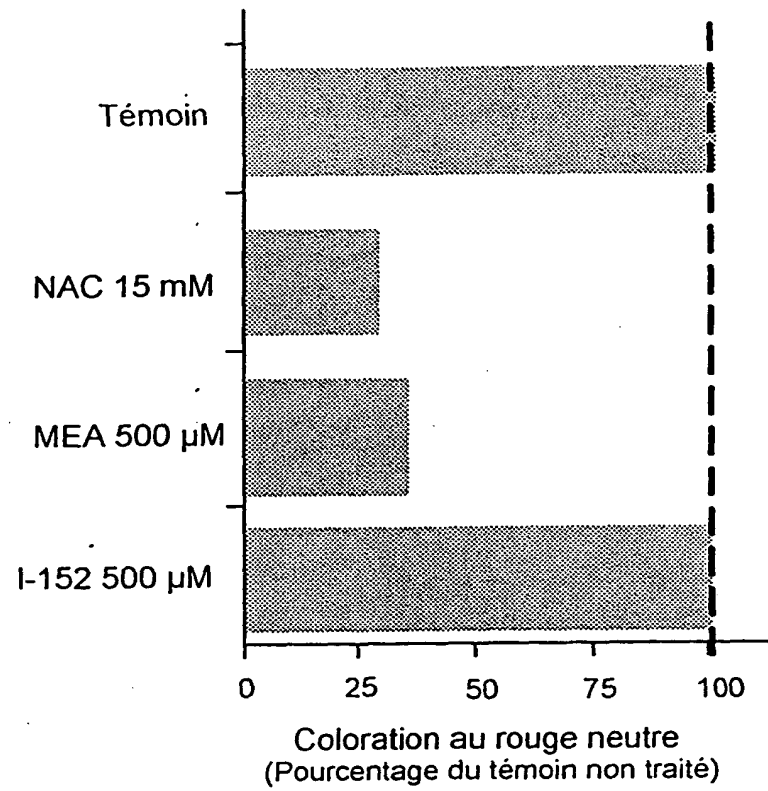
**FIG. 1**

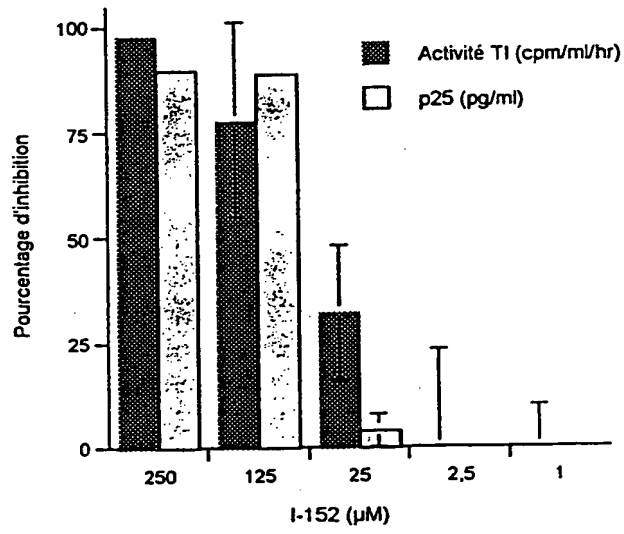
**FIG. 2**

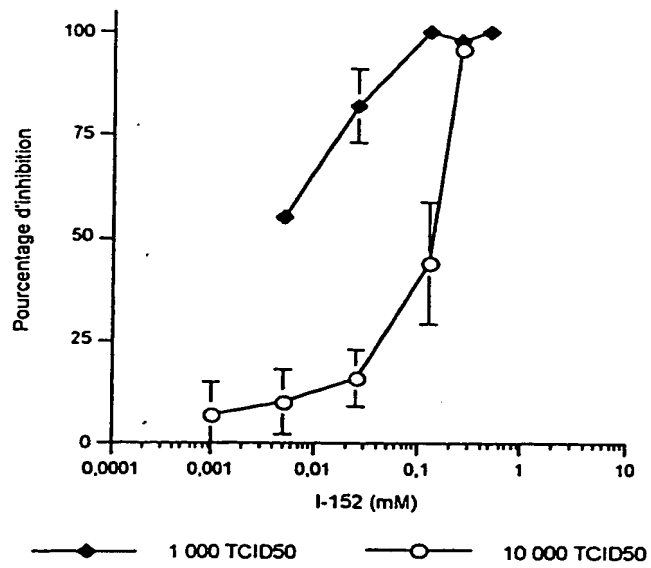
DINET REGIMBEAU

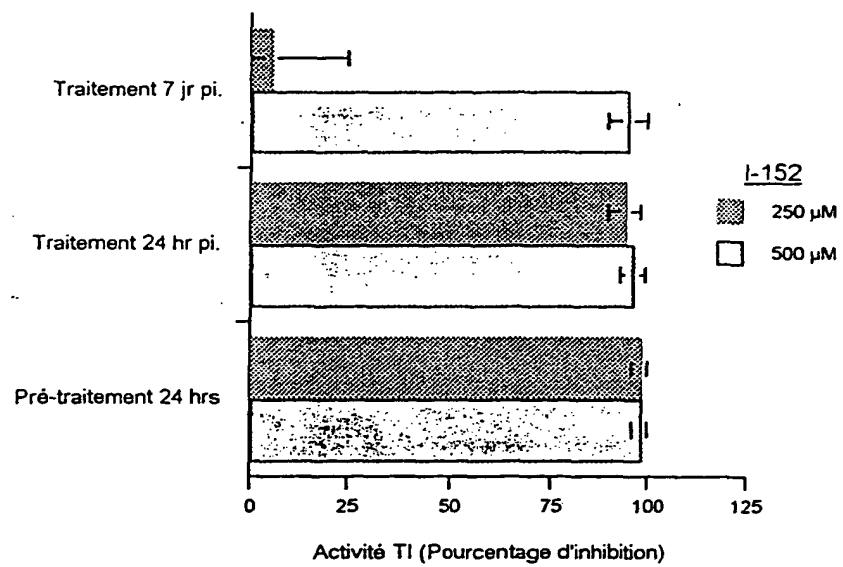
**ORIGINAL**

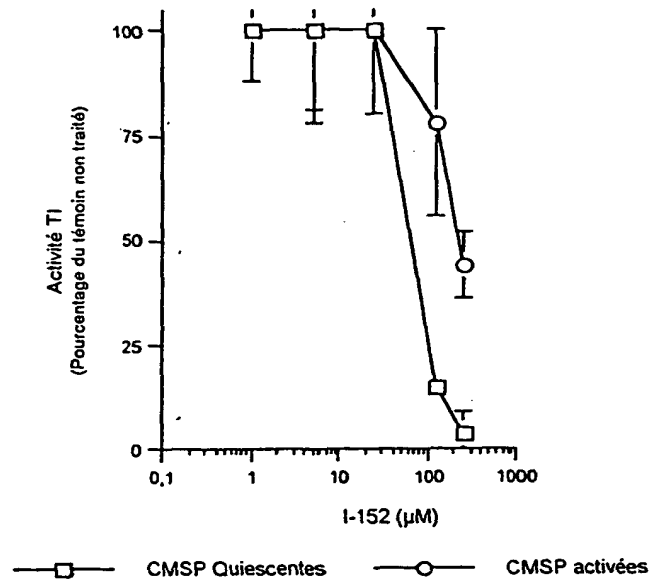


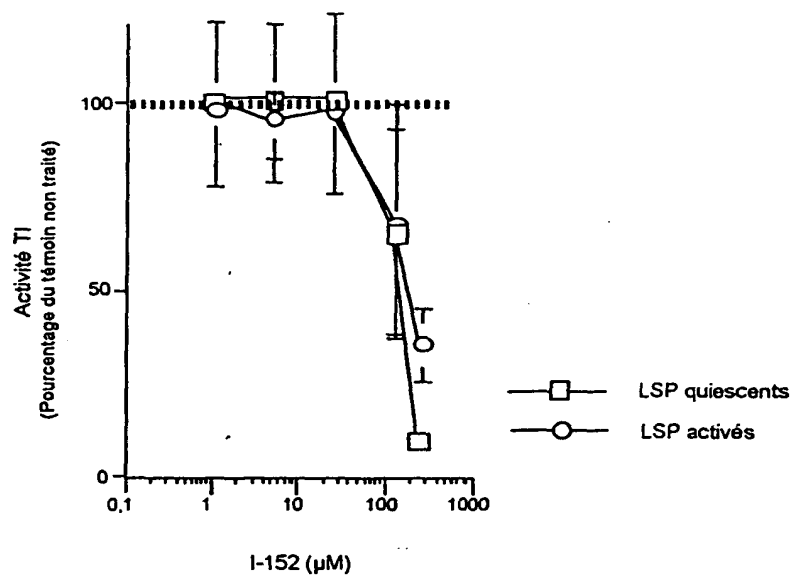
**FIG. 3**

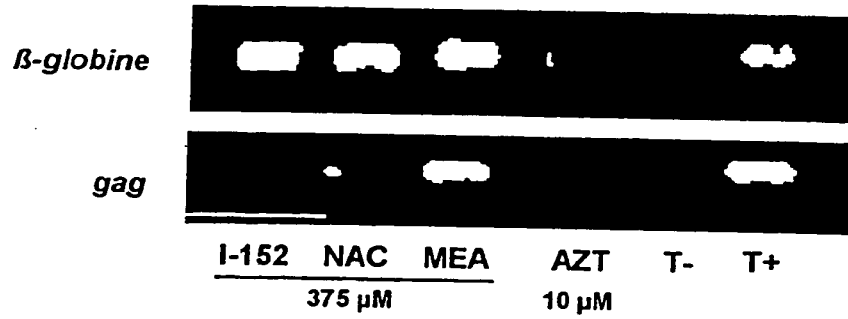
**FIG. 4**

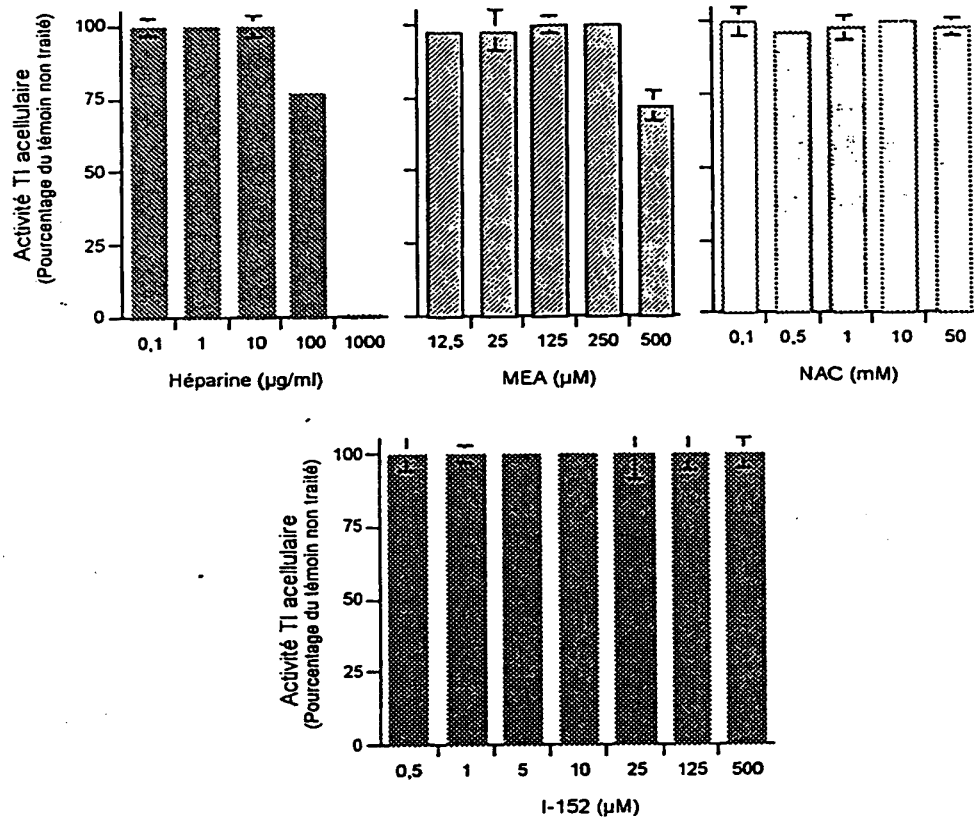
**FIG. 5**

**FIG. 6**

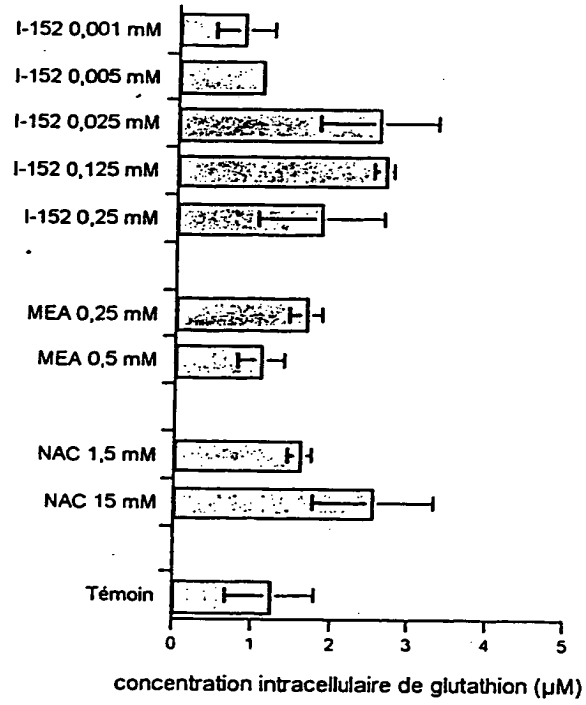
**FIG. 7**

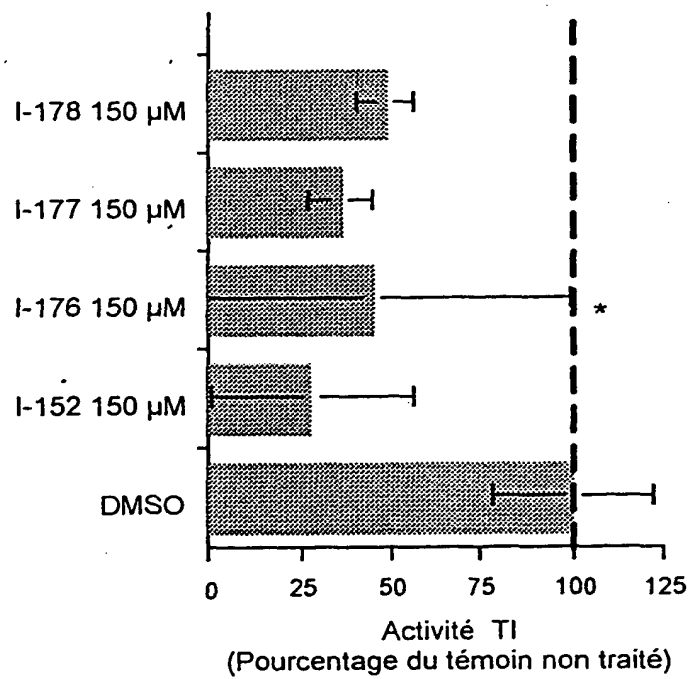
**FIG. 8**

**FIG. 9**

**FIG. 10**



**FIG. 11**

**FIG. 12**

	NAC	MEA	I-152
	Pré-Tt	Pré-Tt	Pré-Tt
DE50	9,4 mM	300 $\mu$ M	50 $\mu$ M
DE70	11 mM	400 $\mu$ M	100 $\mu$ M
DE90	14 mM	600 $\mu$ M	250 $\mu$ M

**TABLEAU I**

SECRET REGIMBEAU  
ORIGINAL

1 10-2-2000

